



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**“Ecología cognitiva de la abeja *Apis mellifera* en cultivos agrícolas: estudios básicos y aplicados en distintos ecosistemas productivos”**

Tesis presentada para optar al Título de Doctor/a de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. María Cecilia Estravis Barcala**

Director de tesis: Dr. Walter M. Farina

Directora adjunta de tesis: Dra. Florencia Palottini

Consejero de Estudios: Dr. David Bilenca

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos Sociales. IFIBYNE-CONICET. DBBE-FCEN-UBA.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, abril de 2022.

# Ecología cognitiva de la abeja *Apis mellifera* en cultivos agrícolas: estudios básicos y aplicados en distintos ecosistemas productivos

## Resumen

La abeja *Apis mellifera* es el principal polinizador introducido en sistemas agrícolas, cuya producción depende de la contratación de colmenas trashumantes que son trasladadas temporalmente hacia cultivos para brindar servicios de polinización. Al arribar, las abejas deben aprender las características del nuevo entorno, mostrando una gran plasticidad conductual para encontrar, discriminar y memorizar las fuentes de alimento más productivas. Entre los procesos cognitivos implicados en el comportamiento recolector, el aprendizaje de los olores florales y la formación de memorias olfativas juegan un papel importante en la explotación de recursos. A pesar del rol dominante de *A. mellifera* como polinizador introducido en sistemas agrícolas, su eficiencia puede verse limitada frente a otras abejas nativas en ciertos cultivos, tales como el girasol *Helianthus annuus* para la producción de semillas híbridas, el arándano de tipo 'Southern highbush' *Vaccinium corymbosum* y el kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*. En esta Tesis se planteó el estudio del comportamiento recolector de *A. mellifera* frente a otras especies nativas, silvestres o manejadas, integrando aspectos ecológicos y comportamentales del polinizador así como ecofisiológicos del cultivo a polinizar. En primer lugar, se observó que en cultivos de girasol con un marcado dimorfismo parental, las abejas *A. mellifera* y las abejas nativas solitarias del género *Melissodes* presentaron una distribución espacial y una recolección de recursos diferencial entre las líneas parentales dadoras de polen (macho fértil, MF) y las líneas productoras de semillas (macho estéril, ME). En relación con la transferencia de polen desde plantas MF a plantas ME, aunque ambos grupos exhibieron una alta constancia floral en inflorescencias MF, se encontró polen de girasol en el cuerpo de la mayoría de las abejas melíferas capturadas en plantas ME, por lo cual los granos de polen serían transferidos a las inflorescencias productoras de semilla por las abejas sociales. En segundo lugar, en una plantación mixta de dos cultivares de arándano, las abejas *A. mellifera* y los abejorros nativos *Bombus pauloensis* (provenientes de colonias comerciales) recolectaron recursos eficientemente de las flores de arándano, mostrando patrones de comportamiento complementarios. Mientras los abejorros mostraron una mayor frecuencia de visitas y una mayor recolección de polen de arándano durante todo el día, las abejas melíferas pudieron compensar las limitaciones que las flores de arándano les imponen, gracias a su superioridad numérica y a una mayor tendencia a alternar entre cultivares en sus sucesivas visitas, lo cual promovería la polinización cruzada. Por otro lado, teniendo en cuenta las habilidades cognitivas de *A. mellifera* para aprender olores florales, en esta Tesis se propuso desarrollar herramientas que permitan sesgar sus preferencias recolectoras en base a memorias olfativas. Para ello, se colectaron y analizaron los volátiles florales de los cultivos de arándano y kiwi, a partir de los cuales se desarrollaron distintas mezclas sintéticas candidatas. Las mezclas elegidas como los Formulados Específicos fueron aquéllas que las abejas no pudieron discriminar del olor floral natural de cada cultivo en condicionamientos olfativos bajo el paradigma de respuesta de extensión de probóscide (REP). En una segunda etapa a campo, se estimularon colmenas utilizadas para servicios de polinización con el Formulado Específico, evaluando distintas variables relacionadas con la actividad recolectora de las abejas, así como con el rendimiento de los cultivos. Si bien los incrementos no resultaron estadísticamente significativos para todas las

variables evaluadas, se observaron tendencias positivas tanto en la actividad recolectora de la abeja como en el rinde de los cultivos. En suma, los resultados de esta Tesis permiten una mayor comprensión del comportamiento recolector de las abejas melíferas en tres cultivos altamente dependientes de polinización entomófila y de su interacción con otros polinizadores nativos silvestres o introducidos. Asimismo, aportan evidencia a favor del uso de la estimulación olfativa como herramienta para sesgar el comportamiento de las abejas hacia el cultivo de interés y así incrementar su eficiencia polinizadora en sistemas agrícolas.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, comportamiento recolector, aprendizaje asociativo, polinización dirigida, abejas nativas, *Helianthus annuus*, *Vaccinium corymbosum*, *Actinidia chinensis*

# Cognitive ecology of *Apis mellifera* in agroecosystems: basic and applied studies in different commercial crops

## Abstract

The honeybee *Apis mellifera* is the main managed pollinator in agroecosystems, whose production relies on hundreds of beehives which are temporarily introduced in the fields to provide pollination services. After arrival, honeybees must learn and remember features of a novel environment, showing great behavioural plasticity in the location, discrimination and memorization of profitable food sources. Among the cognitive processes involved in the foraging behaviour, the learning of floral scents and the formation of olfactory memories play a crucial role in the exploitation of resources. Despite the honeybee dominance as managed pollinator in agroecosystems, its efficiency can be limited in certain crops, such as sunflower (*Helianthus annuus*) for hybrid seed production, Southern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and kiwifruit (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*). In this Thesis, *A. mellifera* foraging behaviour was studied in relation to other wild or managed native bees, considering ecological and behavioural aspects of the pollinators as well as ecophysiological characteristics of the crops. Firstly, honeybees and native solitary bees of the genus *Melissodes* visiting a highly dimorphic sunflower hybrid presented differential spatial distribution and foraging patterns between the pollen-donor (male fertile, MF) and the seed-producing (male sterile, MS) parental lines. In regard to the transfer of pollen from MF to MS sunflowers, although both groups exhibited high floral constancy when foraging in MF, sunflower pollen was found on the body of the great majority of honeybees captured on MS inflorescences, thus indicating that sunflower pollen could be potentially transferred by social bees. Secondly, honeybees and managed native bumblebees *Bombus pauloensis* showed complementary foraging patterns in a mixed blueberry plantation of two co-blooming cultivars. While bumblebees visited more flowers and carried more blueberry pollen throughout the day, the greater the worker population of honeybees was able to overcome the difficulties imposed by the specialized flower morphology of this crop. Also, honeybees were more likely to switch between cultivars than bumblebees, thus promoting cross-pollination. On the other hand, given *A. mellifera* cognitive abilities to learn floral scents, in this Thesis the development of tools which aimed to bias their foraging preferences based on their olfactory memories was proposed. To this end, the volatiles of blueberry and kiwifruit flowers were collected and analysed, and were then considered for the formulation of different synthetic odorant mixtures. The blends selected as Specific Mimic Odours were those which honeybees could not discriminate from the natural floral scent of each crop in olfactory conditioning protocols under the proboscis extension reflex (PER) paradigm. During a second phase in the field, beehives providing pollination services were stimulated with the Specific Mimic Odours and different variables related to honeybee foraging activity, as well as to the crops yield, were assessed. Although the observed increases did not result statistically significant in all variables measured, positive trends were found both in honeybee foraging activity and in crops yields. Altogether, the results provide valuable knowledge for a more thorough understanding of honeybee foraging behaviour in three highly pollinator-dependent crops and their interaction with other wild and managed native bees. Moreover, this Thesis presents evidence supporting the use of olfactory stimulation as a tool to bias honeybees towards a target crop, thus potentially increasing their pollination efficiency in agroecosystems.

**Keywords:** *Apis mellifera*, foraging behaviour, associative learning, precision pollination, native bees, *Helianthus annuus*, *Vaccinium corymbosum*, *Actinidia chinensis*

## *Agradecimientos*

En primer lugar, agradezco enormemente a mis directores: gracias a Walter por abrirme las puertas del laboratorio y del trabajo en ciencia (estaré siempre agradecida a Walter y a Roxy por abrirme las puertas de INSSOC); y gracias a Flor, con quien formamos equipo desde el primer día. Entre los tres compartimos largas horas de trabajo, de discusión y de crecimiento, y por suerte, de risa también en los largos días de campaña. Momentos que me llevo en el corazón.

Gracias a todo el grupo de INSSOC, lxs más antiguxs y lxs más “nuevxs”, lxs actuales y lxs que ya no están en el laboratorio, lxs locales y lxs extranjeroxs. Fue un placer compartir este proceso con todxs ustedes, de quienes aprendí un montón y con quienes me divertí a rolete en estos años. Gracias a Héctor por estar ahí y por compartirme semillas, plantas, historias y tantos secretos de la huerta.

Gracias a mis amigxs que son familia (China, Flor, Lula, Cachila, Leo, Pau, Pato, Gabi, Marce), incondicionales, apoyándome en la aventura de “saltar al vacío” y empezar un doctorado después de los 35... Gracias por la confianza, por la contención y por celebrar tanto como yo este logro.

Gracias a mi familia por estar ahí y siempre tenerme fe. Gracias especiales a mi mamá, que es mi fan número uno, a quien dedico esta tesis. Gracias a mi papá por acompañarme en este momento. Gracias Pau, Iván, Tomi, Luqui, Feli, Basti y Matheo, la mejor hinchada que una puede tener.

Y gracias infinitas a Gus, por bancarme en esta etapa final de mucho nervio, por apoyarme en todo y por las risas compartidas.

¡Muchas gracias a todxs porque sin ustedes nada hubiera sido igual!

## Contenido

<b>1. Introducción general</b> .....	<b>1</b>
1.1. La abeja <i>Apis mellifera</i> .....	1
1.2. El comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> .....	2
1.3. Aprendizaje asociativo.....	5
1.3.1. Condicionamiento olfativo clásico y operante.....	5
1.3.2. Discriminación y generalización de fragancias florales.....	7
1.3.3. Aprendizaje y comunicación en la colmena.....	9
1.4. Ecología cognitiva de <i>Apis mellifera</i> .....	10
1.5. Servicios de polinización de cultivos mediados por colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	12
1.5.1. Polinizadores no- <i>Apis</i> .....	15
1.6. Cultivos dependientes del servicio de polinización.....	17
1.6.1. Cultivos de girasol.....	17
1.6.2. Cultivos de arándano.....	19
1.6.1. Cultivos de kiwi.....	20
1.7. Desarrollo de herramientas para influenciar el comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> .....	22
1.8. Objetivos.....	23
1.8.1. Objetivos particulares e hipótesis.....	23
<b>2. Comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> y de abejas solitarias nativas en cultivos de girasol para la producción de semillas híbridas</b> .....	<b>26</b>
2.1. Introducción.....	26
2.2. Materiales y métodos.....	28
2.2.1. Sitio de estudio y animales.....	28
2.2.2. Caracterización de las líneas parentales.....	29
2.2.3. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Melissodes</i> spp. en ambos parentales.....	30
2.2.4. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Melissodes</i> spp. a escala individual.....	30
2.2.4.1. Número de inflorescencias visitadas y recursos recolectados.....	30
2.2.4.2. Constancia floral y potencial transferencia de polen entre parentales.....	31
2.2.5. Análisis estadístico.....	32
2.3. Resultados.....	34
2.3.1. Caracterización de las líneas parentales.....	34
2.3.2. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Melissodes</i> spp. en ambos parentales.....	34
2.3.3. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Melissodes</i> spp. a escala individual.....	36
2.3.3.1. Número de inflorescencias y recursos recolectados.....	36
2.3.3.2. Constancia floral y potencial transferencia de polen entre parentales.....	37

2.4. Discusión .....	39
<b>3. Comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> y del abejorro nativo <i>Bombus pauloensis</i> en cultivos de arándano ..</b>	<b>45</b>
3.1. Introducción .....	45
3.2. Materiales y métodos .....	48
3.2.1. Sitio de estudio y animales.....	48
3.2.2. Caracterización de los cultivares de arándano.....	49
3.2.3. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Bombus pauloensis</i> a escala poblacional.....	51
3.2.4. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Bombus pauloensis</i> a escala individual.....	51
3.2.4.1. Número de flores y recursos recolectados .....	51
3.2.4.2. Carga de polen en el cuerpo de las recolectoras .....	52
3.2.4.3. Constancia floral.....	53
3.2.5. Análisis estadístico.....	53
3.3. Resultados .....	55
3.3.1. Caracterización de los cultivares de arándano.....	55
3.3.2. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Bombus pauloensis</i> a escala poblacional.....	56
3.3.3. Patrón de recolección de <i>Apis mellifera</i> y <i>Bombus pauloensis</i> a escala individual.....	57
3.3.3.1. Número de flores y recursos recolectados .....	57
3.3.3.2. Carga de polen en el cuerpo de las recolectoras .....	59
3.3.3.3. Constancia floral.....	60
3.4. Discusión .....	61
<b>4. Desarrollo y evaluación del efecto de formulados sintéticos específicos sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de arándano y de kiwi .....</b>	<b>67</b>
4.1. Introducción .....	67
4.2. Materiales y métodos .....	71
4.2.1. Desarrollo y evaluación del Formulador Arándano.....	71
4.2.1.1. Sitios de estudio, animales y olores puros.....	71
4.2.1.2. Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de arándano .....	72
4.2.1.3. Condicionamientos olfativos .....	74
4.2.1.4. Efecto del Formulador Arándano sobre el comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> en cultivos de arándano .....	76
4.2.1.4.1. Estimulación olfativa de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	76
4.2.1.4.2. Actividad recolectora general de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	77
4.2.1.4.3. Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	77
4.2.1.5. Efecto del Formulador Arándano sobre el rendimiento de cultivos de arándano.....	78
4.2.2. Desarrollo y evaluación del Formulador Kiwi.....	79
4.2.2.1. Sitios de estudio, animales y olores puros.....	79
4.2.2.2. Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de kiwi .....	80
4.2.2.3. Condicionamientos olfativos absolutos.....	82
4.2.2.4. Condicionamientos olfativos diferenciales .....	83
4.2.2.5. Efecto del Formulador Kiwi sobre el comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> en cultivos de kiwi.....	84



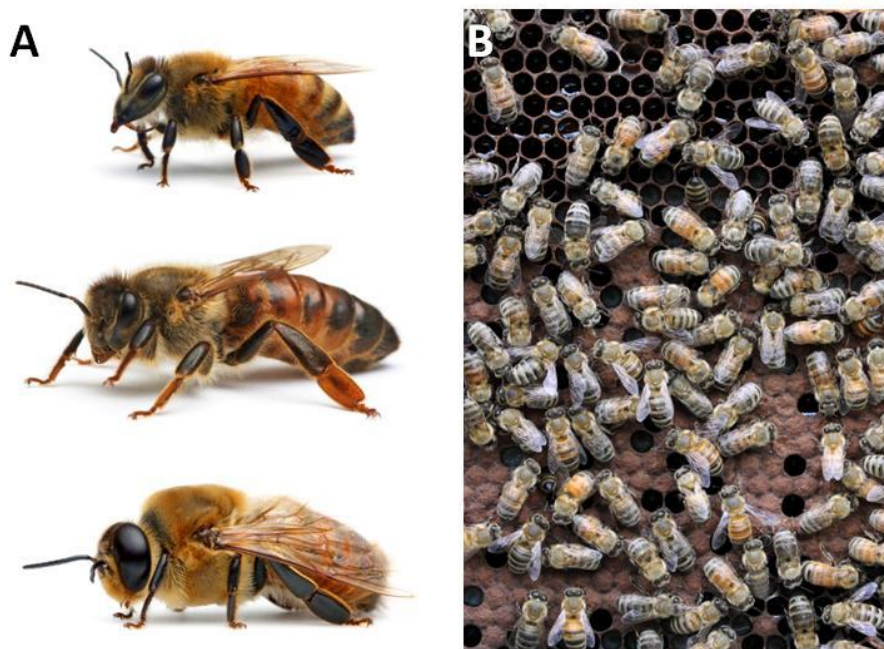
4.2.2.5.1. Estimulación olfativa de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	84
4.2.2.5.2. Actividad recolectora general de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	85
4.2.2.5.3. Actividad recolectora de polen de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	85
4.2.2.5.4. Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	86
4.2.2.6. Efecto del Formulado Kiwi sobre el rendimiento de cultivos de kiwi.....	87
4.2.3. Análisis estadístico.....	87
4.3. Resultados .....	90
4.3.1. Desarrollo y evaluación del Formulado Arándano.....	90
4.3.1.1. Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de arándano .....	90
4.3.1.2. Condicionamientos olfativos .....	90
4.3.1.3. Efecto del Formulado Arándano sobre el comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> en cultivos de arándano .....	92
4.3.1.3.1. Actividad recolectora general de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	92
4.3.1.3.2. Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	95
4.3.1.3.4. Efecto del Formulado Arándano sobre el rendimiento de cultivos de arándano .....	95
4.3.2. Desarrollo y evaluación del Formulado Kiwi.....	96
4.3.2.1. Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de kiwi .....	96
4.3.2.2. Condicionamientos olfativos absolutos.....	97
4.3.2.3. Condicionamientos olfativos diferenciales .....	98
4.3.2.4. Efecto del Formulado Kiwi sobre el comportamiento recolector de <i>Apis mellifera</i> en cultivos de kiwi.....	101
4.3.2.4.1. Actividad recolectora general de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	102
4.3.2.4.2. Actividad recolectora de polen de las colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	102
4.3.2.4.3. Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de <i>Apis mellifera</i> .....	103
4.3.2.5. Efecto del Formulado Kiwi sobre el rendimiento de cultivos de kiwi.....	103
4.4. Discusión .....	104
<b>5. Discusión general .....</b>	<b>111</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>118</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>134</b>
Anexo A: Imágenes satelitales de los cultivos evaluados.....	134
Anexo B: Tablas estadísticas.....	120
Anexo C: Tablas y figuras suplementarias.....	147
Anexo D: Métodos suplementarios.....	158
<b>8. Contenido bajo licencia .....</b>	<b>159</b>

## Introducción general

### 1.1 La abeja *Apis mellifera*

*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) es la especie de abejas con mayor distribución en el mundo (Michener, 1974), habiendo llegado a todos los continentes, excepto la Antártida, de la mano de la actividad humana. Además de haber sido domesticada desde tiempos muy lejanos para la obtención de miel y otros productos de la colmena (como polen, propóleo, cera, etc.), la abeja melífera es el polinizador comercial más utilizado en entornos agrícolas (McGregor, 1976; Delaplane y Mayer, 2000).

Las abejas melíferas son insectos eusociales, es decir, presentan división reproductiva del trabajo, cooperación en el cuidado de la cría y solapamiento de generaciones que contribuyen en las tareas dentro de la colonia (Michener, 1974). Dentro de la colonia se distinguen tres castas: la reina y los zánganos conforman las castas reproductivas, mientras que las obreras conforman la casta no reproductiva. Una colonia típica está constituida por una única reina (hembra fértil), desde ningún a cientos de zánganos (machos) dependiendo de la época del año, y entre 10 y 40 mil obreras (todas hembras) (Figura 1.1) (Winston, 1987).



**Figura 1.1. La abeja *Apis mellifera*.** (A) Castas. De arriba hacia abajo: abeja obrera, reina y zángano. (B) Abejas obreras dentro de la colmena, la casta más numerosa. Crédito fotográfico: Alex Wild©.

Las obreras representan la casta más numerosa de la colonia y llevan a cabo diversas tareas de acuerdo a la edad. Debido a este fenómeno conocido como polietismo etario, las obreras pasan progresivamente de realizar tareas dentro del nido a llevar a cabo otras en el exterior (Lindauer, 1952; Seeley, 1982). Así, en los primeros días de su vida adulta las obreras se dedican a tareas de limpieza o cuidado de la cría, mientras que a partir del día 17 se ocupan de la recolección de recursos (néctar, polen, agua, resinas) o de la defensa del nido.

En las abejas sociales la colonia opera como una unidad integrada o superorganismo (Hölldobler y Wilson, 2008), y su supervivencia depende tanto de la eficiencia individual como de la tarea coordinada de todos sus miembros (Núñez, 1982). Mediante estrategias individuales y colectivas la colonia obtiene recursos del ambiente para cubrir sus necesidades a lo largo del ciclo anual (Lindauer, 1961). En climas templados fríos, este ciclo comienza luego del solsticio de invierno cuando los días comienzan a alargarse y la colonia, que en ese momento está conformada por un grupo reducido de individuos dentro de la colmena, comienza a incrementar su temperatura central y a desarrollar nueva cría. A principios de la primavera, con el aumento de la oferta floral, el flujo de entrada de néctar dispara la puesta de huevos y para fines de la primavera la población de la colonia habrá alcanzado su máximo desarrollo y estará lista para reproducirse a través de enjambres. Durante la primavera y el verano, cuando las condiciones son favorables y hay abundancia y diversidad de flores, las abejas recolectan una gran cantidad de recursos para consumir y para alimentar a la cría, y también almacenan parte de los mismos en el interior de la colmena para ser consumidos durante el otoño y el invierno, cuando disminuye la disponibilidad de recursos en el ambiente (von Frisch, 1967; Winston, 1987).

## **1.2 El comportamiento recolector de *Apis mellifera***

Los insectos sociales son recolectores de lugar central (Orians y Pearson, 1979); lo cual significa que cada individuo recolector regresa a un lugar central (el nido) luego de un ciclo de recolección, donde los recursos son procesados, almacenados y utilizados por otros miembros de la colonia. En un ambiente dinámico en el cual la oferta floral no se mantiene constante en el tiempo, la recolección de recursos es un proceso altamente coordinado e implica un equilibrio entre decisiones que maximicen la eficiencia de recolección individual de una fuente rica a corto plazo, y aquellas que optimicen la explotación de recursos considerando a la colonia como un todo a largo plazo (Núñez, 1982). Para obtener recursos las abejas recolectoras pueden volar grandes distancias, recorriendo un área de 6

km a la redonda de la colmena, e incluso llegar hasta 14 km frente a la escasez de flores (Seeley, 1995).

Las abejas recolectan néctar, polen, agua y resinas de los entornos cercanos a la colmena. El néctar es la fuente principal de hidratos de carbono, aunque también contiene aminoácidos, vitaminas, minerales, lípidos, proteínas y metabolitos secundarios, los cuales pueden afectar la preferencia de las abejas (Nicolson *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2017). El polen es la fuente natural de proteínas y aminoácidos esenciales, y constituye el principal alimento de las larvas de la casta obrera en forma de pan de abeja (Herbert, 1992; Zhu *et al.*, 2017). La cantidad de cría y de reservas de alimento de la colonia así como la oferta floral disponible en el ambiente, la cual es variable en términos cuantitativos y cualitativos de acuerdo a la estación del año, influirá en el total de obreras destinadas a la recolección de néctar o de polen (Free, 1967; Pankiw *et al.*, 1998; Pernal y Currie, 2001). Además, la recolección de dichas recompensas implica el uso de distintas estructuras de las abejas (tales como la probóscide, el buche y las corbículas de las patas posteriores) y diferentes comportamientos en la flor, y frecuentemente las obreras tienden a especializarse en explotar uno u otro recurso en cada vuelo de recolección (Fewell y Page, 1993).

Las abejas melíferas son altamente generalistas o polilécticas, pudiendo interactuar con numerosas especies de plantas tanto cultivadas como silvestres, lo cual les permitió adaptarse a los distintos ambientes donde viven. Si bien las abejas obtienen néctar y polen de una gran variedad de plantas, su composición química varía y no todos los pólenes cumplen con los requerimientos nutricionales de las abejas, debido a un bajo contenido de proteína cruda o a la deficiencia en algún aminoácido esencial (Somerville, 2001). El acceso a una dieta diversificada resulta especialmente relevante para la colonia antes del comienzo de la temporada invernal (Dolezal *et al.*, 2019; St. Clair *et al.*, 2020), ya que una dieta polifloral está directamente relacionada con mayores niveles de inmunidad individual y social respecto de una dieta monofloral (Alaux *et al.*, 2010). En línea con esto, en la actualidad, la disminución de la diversidad de recursos alimenticios a la cual se enfrentan las abejas debido a la fragmentación de hábitats y a la intensificación agrícola, puede llevar a la pérdida de colmenas (Potts *et al.* 2010).

Por otra parte, las abejas melíferas presentan constancia floral, es decir, restringen sus visitas a una determinada especie o a un determinado morfotipo floral durante un mismo vuelo de recolección (Aristóteles, ca. 340 A.C.; Grant, 1950; Free, 1963; Waser, 1986). Este comportamiento no es fijo y está guiado por la experiencia previa de los individuos recolectores que al especializarse temporariamente en un tipo floral, pueden incrementar su eficiencia de recolección (Faegri y van der

Pijl, 1980; Menzel, 2001). En consecuencia, las abejas son capaces de aprovechar un recurso productivo mientras se encuentre disponible, aunque ignoren otros tipos florales con igual o hasta mayor recompensa (Hill *et al.*, 1997). De todas maneras, esta fidelidad no es estática y distintos individuos pueden mostrar preferencia por diferentes tipos florales. Una de las implicancias de la constancia floral es que facilitaría la transferencia de polen conoespecífico entre plantas y, por ende, contribuiría positivamente a su polinización. Sin embargo, ciertas especies dioicas, las cuales requieren que el polen sea transferido desde las flores masculinas a las flores femeninas, pueden presentar un marcado dimorfismo entre ambos parentales. En ese caso, las abejas podrían presentar constancia a uno de ellos, lo cual no favorecería la polinización cruzada. En particular, en el caso de especies cultivadas para la producción de semillas, como por ejemplo ciertos híbridos de girasol, se ha encontrado que aquellos híbridos con mayor grado de dimorfismo (en términos del tamaño de la inflorescencia y de la altura de la planta) se corresponden con una mayor constancia floral de las abejas, resultando en un menor número de entrecruzamiento entre parentales (Susic Martin y Farina, 2016). En ese caso, la transferencia de polen podría darse mediante el contacto entre individuos dentro del nido (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993; Susic Martin y Farina, 2016). La presencia de polen de girasol adherido en el cuerpo de abejas no recolectoras en la entrada del nido indicaría que las mismas podrían actuar como agentes de propagación de polen entre aquellas recolectoras que regresan a la colmena luego de visitar uno de los parentales y otras que parten y visitan flores del otro parental (Susic Martin y Farina, 2016); de esta forma, las interacciones de abejas sociales podrían compensar parcialmente la baja frecuencia de cruzamientos entre parentales.

Al regresar a la colmena, las abejas recolectoras descargan el alimento que traen consigo. En el caso del néctar, éste es transferido de manera directa por contactos boca a boca (trofalaxia) a otras compañeras de nido, las que posteriormente procesan y almacenan este recurso (von Frisch, 1967). Por otra parte, cuando una recolectora encuentra una fuente de alimento rica en néctar o polen, es capaz de reclutar a sus compañeras de nido, y de esa manera maximizar la explotación de los recursos disponibles. Un mecanismo de reclutamiento muy estudiado es el comportamiento estereotipado conocido como la danza de contoneo (von Frisch, 1967). En el mismo, la abeja que retorna de una recolección exitosa de recursos brinda información de la ubicación de la fuente de alimento (en términos de distancia de la colmena y dirección relativa al sol), y facilita la transferencia de otro tipo de información como las fragancias florales (Díaz *et al.*, 2007; Balbuena *et al.*, 2012a). Asimismo, la intensidad de la danza (evidenciada como vibraciones abdominales más pronunciadas) depende de la productividad de la fuente explotada, resultando mayores la duración e intensidad de la fase de contoneo de danzas al tratarse de fuentes más productivas (Seeley *et al.*, 2000; Hrnčir *et al.*, 2011). En este sentido, las interacciones sociales dentro del nido facilitan la transmisión de información

acerca de los recursos disponibles en el exterior entre la mayoría de los miembros de la colonia, y permiten ajustar rápidamente el comportamiento recolector, dirigiendo la fuerza recolectora de la colonia hacia los recursos más abundantes (von Frisch, 1967; Seeley, 1995; Farina y Grüter, 2009).

### **1.3 Aprendizaje asociativo**

El aprendizaje es el proceso por el cual los animales alteran su comportamiento como resultado de la experiencia (Carew, 2000). Durante la recolección de alimento las abejas aprenden claves olfativas, visuales y gustativas de las flores, las cuales les permiten orientarse y encontrar una fuente rica de recursos en los sucesivos ciclos de recolección (von Frisch, 1967). En un ambiente fluctuante, la supervivencia de la colonia dependerá del aprendizaje de nuevas claves que guiarán a las recolectoras a las fuentes de alimento más productivas, de manera de optimizar la explotación de los recursos disponibles.

En el marco de la teoría del aprendizaje, se define al aprendizaje asociativo como aquel que ocurre cuando se establece una asociación entre dos o más estímulos, y constituye una habilidad que les permite a los animales establecer relaciones predictivas entre eventos, y así extraer reglas del mundo en el que viven (Kandel *et al.*, 1992; Giurfa, 2007). En este tipo de aprendizaje se establece una contingencia entre un estímulo *a priori* neutro y un estímulo biológicamente relevante o refuerzo, el cual provoca una respuesta conspicua en el individuo. Al establecerse dicha contingencia, el estímulo neutro adquiere carácter predictivo del refuerzo, lo cual les permite a los animales anticipar eventos relevantes, reducir su nivel de incertidumbre y, en el contexto de búsqueda de alimento, optimizar la explotación de los recursos disponibles (Giurfa, 2007). En línea con esto, la capacidad de las abejas melíferas de asociar claves olfativas y visuales de las flores con su recompensa (por ejemplo, un néctar rico en azúcares) ha sido muy bien estudiada (von Frisch, 1919; Menzel y Erber, 1978; Menzel, 1999).

#### **1.3.1 Condicionamiento olfativo clásico y operante**

Es posible estudiar el aprendizaje asociativo en condiciones controladas de laboratorio mediante el condicionamiento clásico (Pavlov, 1927) y el condicionamiento instrumental u operante (Skinner, 1938). En el primero, luego de sucesivas presentaciones del estímulo neutro apareadas a la presentación del refuerzo (EI, estímulo incondicionado), el animal establece la asociación entre el

estímulo neutro, ahora estímulo condicionado (EC), y el EI. Así, la sola presentación del EC provoca la respuesta comportamental en el individuo, la cual deviene en una respuesta condicionada (RC). En el condicionamiento operante el animal aprende a asociar un comportamiento propio con un refuerzo positivo o negativo, provocando que su comportamiento (respuesta operante) sea fortalecido o debilitado, respectivamente. La búsqueda de fuentes de alimento por abejas recolectoras fuera de la colmena se basa en ambos tipos de procesos asociativos: (1) el condicionamiento clásico, estableciendo una contingencia entre las claves florales (por ejemplo, el olor) y la recompensa de néctar, y (2) el condicionamiento operante estableciendo una contingencia entre su comportamiento (volar hacia un estímulo discriminativo) y el resultado de dicho comportamiento (volar hacia una flor y obtener una recompensa), y entre el estímulo discriminativo (por ejemplo, el olor floral) y el comportamiento de la abeja (von Frisch, 1923, 1943). Ambos tipos de aprendizaje asociativos se vinculan con el mismo contexto apetitivo de búsqueda de alimento, pero implican distintos tipos de asociaciones que han sido abordadas experimentalmente (Mauelshagen y Greggers, 1993; Sandoz *et al.*, 2000).

En el caso del condicionamiento olfativo clásico, existe un protocolo bien establecido para abejas melíferas bajo el paradigma de la respuesta de extensión de probóscide (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). La respuesta de extensión de probóscide (REP) es una respuesta refleja e innata que ocurre en la naturaleza cuando una abeja contacta con sus antenas o tarsos el néctar de las flores, y le permite recolectar el néctar desde allí (Figura 1.2A). En el laboratorio, es posible evocar dicha respuesta refleja al contactar las antenas de abejas amarradas con un palillo embebido en solución azucarada (Figura 1.2B). En un condicionamiento olfativo clásico, es factible condicionar la REP al presentar de manera pareada un olor a priori neutro (estímulo condicionado, EC) y una recompensa de solución azucarada (estímulo incondicionado, EI), contactando las antenas con un palillo y permitiendo la ingesta según la secuencia temporal detallada en el protocolo (Bitterman *et al.*, 1983). En el condicionamiento olfativo absoluto, un único olor es presentado junto con el refuerzo positivo, mientras que en el condicionamiento olfativo diferencial se presentan dos olores, uno recompensado (EC+) y otro no recompensado (EC-) (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983).



**Figura 1.2. Respuesta refleja de extensión de probóscide (REP) de la abeja melífera.** Esta respuesta sucede cuando la abeja recolecta néctar en una flor (A) y también puede evocarse bajo condiciones de laboratorio al contactar sus antenas con un palillo embebido en solución azucarada (B). Créditos fotográficos: (A), Alexander Wild © y (B), INSSOC.

### 1.3.2 Discriminación y generalización de fragancias florales

En entornos naturales, las abejas melíferas rara vez se enfrentan a dos estímulos idénticos. Sin embargo, son capaces de reconocer flores de la misma especie en estados fenológicos diferentes que pueden diferir, por ejemplo, en la intensidad de su fragancia. Es decir, las abejas pueden generalizar claves olfativas aprendidas frente a estímulos novedosos similares y tratarlos como equivalentes (pertenecientes a una misma clase o región de su espacio perceptual), y en consecuencia presentar el mismo comportamiento (Shepard, 1987). A su vez, las abejas se encuentran con flores de otras especies, cuyas fragancias pueden ser discriminadas ya que las abejas son capaces de percibir dichos estímulos como distintos entre sí. Con el fin de evaluar la capacidad de las abejas de generalizar o discriminar olores en condiciones controladas de laboratorio, es posible someterlas a un protocolo de condicionamiento clásico absoluto, luego del cual se les presenta uno o más olores novedosos sin refuerzo. Al evaluar de a pares 16 compuestos puros (presentes en las fragancias florales) y similares entre sí en su estructura química, o bien en su largo de cadena carbonada o en el grupo funcional, se ha visto que las abejas fueron capaces de generalizar olores que compartían el mismo grupo funcional, mientras que discriminaban más fácilmente entre ellos cuanto mayor era la diferencia en el largo de cadena (Guerrieri *et al.*, 2005). En este sentido, la generalización completa (es decir, la igual respuesta frente al EC y al olor novedoso) no implica que las abejas no pueden discriminar entre ambos, sino que sería un indicativo de que ambos estímulos son perceptualmente muy similares y que



comparten características utilizadas por las abejas para predecir el EI (von Frisch, 1967; Smith *et al.*, 2006).

Por otra parte, el protocolo de condicionamiento diferencial permite evaluar la capacidad de las abejas de discriminar entre los dos estímulos condicionados. En el caso de que las abejas puedan discriminar entre ambos olores, luego de las sucesivas presentaciones los individuos responderán únicamente al EC+ y no responderán al EC-. A su vez, la capacidad de discriminación se ve influenciada por la concentración de los olores, viéndose disminuida para ciertos olores a bajas concentraciones los cuales habían sido claramente discriminados por las abejas en concentraciones altas (Wright y Smith, 2004).

En los estudios mencionados los olores eran presentados de a uno a la vez, ya sea como compuestos puros o bien en concentraciones variables (diluidos en un solvente). Sin embargo, las fragancias florales naturales son una mezcla de numerosos compuestos orgánicos volátiles pertenecientes a distintas familias químicas (Knudsen *et al.*, 1993) y, el tipo de volátiles que emiten las flores, influye en los visitantes que atraen (Dobson, 2006). Al estudiar la percepción de mezclas complejas de numerosos compuestos (más semejantes a fragancias florales naturales) se encontró que los insectos utilizan unos pocos componentes para el reconocimiento de cada mezcla (Blight *et al.*, 1997; Laloi *et al.*, 2000; Riffell *et al.*, 2009; Reinhard *et al.*, 2010). Riffell y colaboradores (2009) analizaron la fragancia floral de *Datura wrightii* y entre más de 60 componentes identificados un conjunto de 9 compuestos evocaron altas respuestas neuronales antenales de su polinizador (el esfíngido *Manduca sexta*). Dichos componentes serían los responsables de mediar las interacciones planta-polinizador, y sólo provocaron respuestas comportamentales en el insecto al ser presentados formando parte de una mezcla sintética, y no como componentes puros. Mientras que la respuesta del polinizador frente a la mezcla sintética no se diferenció de la respuesta a la fragancia floral natural, su respuesta frente a una mezcla de otros 9 componentes elegidos al azar disminuyó significativamente (Riffell *et al.*, 2009). Además, *M. sexta* respondió de manera similar a un amplio rango de concentraciones de la mezcla de unos pocos olores clave, lo cual le permitiría al polinizador identificar una determinada planta y percibir su fragancia floral como un mismo estímulo aunque su concentración fluctúe a distintas distancias durante los vuelos de recolección. Por otra parte, se ha propuesto un mínimo de tres compuestos clave en la formulación de mezclas simples que resulten perceptualmente representativas de las fragancias florales originales para insectos polinizadores (Blight *et al.*, 1997; Riffell *et al.*, 2009; Reinhard *et al.*, 2010; Byers *et al.*, 2014). En particular, ensayos con abejas melíferas muestran que las abejas condicionadas a mezclas complejas de 14 compuestos presentan niveles de respuesta selectivamente más altos frente a algunos de los componentes individuales, denominados “olores

clave”, y niveles de respuesta más bajos frente al resto de los componentes de cada mezcla (Reinhard *et al.*, 2010). En ese contexto, las abejas aprenden una selección de olores clave representativos para cada una de las mezclas de olores. Cabe mencionar que la condición de ser un olor clave no dependió de la naturaleza química o de la volatilidad de los compuestos, ni de la facilidad con que pudieron ser aprendidos por las abejas, no pudiendo establecerse un patrón general válido para todos los casos.

Asimismo, las fragancias florales de una misma especie pueden variar tanto en términos cuantitativos como cualitativos dependiendo de factores tales como la edad de la flor, el momento del día, las condiciones ambientales y también en función de si la flor ha sido polinizada (Jakobsen y Olsen, 1994; Schade *et al.*, 2001; Theis y Raguso, 2005; Rodríguez-Saona *et al.*, 2011). Se ha documentado además la variabilidad entre los perfiles de volátiles de distintos cultivares de una misma especie (Rodríguez-Saona *et al.*, 2011; Twidle *et al.*, 2017), situación que puede influenciar la atracción de polinizadores. Más aún, se han obtenido resultados dispares al evaluar la capacidad de abejas de discriminar entre distintos cultivares de una misma especie: mientras las abejas son capaces de distinguir entre los cultivares de boca de dragón (*Antirrhinum majus* Linnaeus), no pueden discriminar entre los cultivares de canola (*Brassica rapa* Linnaeus) (Wright *et al.*, 2002). Estos resultados muestran la complejidad de los estímulos a los que se enfrentan las abejas en entornos naturales y la alta plasticidad conductual que poseen para discriminar y generalizar olores dada su dieta generalista y las experiencias previas adquiridas tanto fuera como dentro del nido.

### **1.3.3 Aprendizaje y comunicación en la colmena**

El aprendizaje de las fragancias florales no sólo ocurre en las flores, sino que también puede ocurrir en la colmena. Por un lado, las abejas recolectoras llevan impregnados en su cuerpo dichas fragancias, las cuales pueden ser percibidas por otras recolectoras en el nido. Dichas claves olfativas resultan más relevantes en el caso de fuentes de alimento cercanas, ya que se van disipando durante el vuelo (von Frisch, 1967). Por otra parte, el olor del néctar recolectado se mantiene intacto dentro del buche de la abeja, sin importar la distancia de la fuente al nido (von Frisch, 1967). Una vez en el nido, al transferir el néctar a otras recolectoras mediante trofalaxia, éstas adquieren información olfativa y gustativa de la fuente de alimento, pudiendo aprender olores vinculados a fuentes productivas de alimento (Farina *et al.*, 2005, 2007; Gil y De Marco, 2005). Asimismo, las abejas jóvenes pre-recolectoras que llevan a cabo tareas dentro del nido también pueden establecer la asociación olor-recompensa mediante trofalaxia (Grüter *et al.*, 2006), y dichas memorias olfativas pueden persistir varios días y afectar sus preferencias recolectoras posteriormente (Balbuena *et al.*, 2012a). Dicha

preferencia se evidencia en una mayor proporción de abejas reclutadas exitosamente a un alimentador artificial aromatizado con el mismo olor previamente experimentado dentro de la colmena mediante el ingreso de alimento aromatizado (a través de recolectoras entrenadas a un alimentador artificial) ocurrido 8 días antes. Más aún, la información olfativa puede ser transmitida mediante otras interacciones sociales que no involucran la danza o la trofalaxia, sino a través de interacciones simples como los contactos corporales entre una recolectora exitosa y sus compañeras de nido (Balbuena *et al.*, 2012b).

Algo semejante ocurre a partir de la circulación de alimento aromatizado ofrecido mediante alimentadores dentro de la colmena, aun cuando dicho alimento no haya sido previamente recolectado por las abejas, y las memorias olfativas así establecidas pueden ser evocadas en el contexto recolector, sesgando sus preferencias en la búsqueda de recursos (Arenas *et al.*, 2007). Además, dichas memorias olfativas son persistentes y pueden afectar la preferencia recolectora de las abejas por hasta 8 días luego de haber removido el alimentador de la colmena (Arenas *et al.*, 2008). Por otra parte, la circulación de volúmenes menores de alimento aromatizado recolectado por abejas con acceso a otras fuentes de recursos (en condiciones más semejantes a las naturales), también permite el aprendizaje del olor dentro de la colmena por parte de abejas de distintas edades (nodrizas, procesadoras y recolectoras), y tales memorias olfativas persisten hasta 10-11 días posteriores al ofrecimiento del alimento aromatizado (Grüter *et al.*, 2009).

En suma, el aprendizaje de fragancias florales dentro de la colmena podría asistir a las recolectoras en la búsqueda y localización de fuentes de alimento, aun habiendo sido aprendidos en edades pre-recolectoras, si dichos recursos se encuentran disponibles durante varios días en el ambiente. De esta manera, la transferencia de información olfativa mediada por el aprendizaje social adquiere gran relevancia, ya que provee de información acerca de las fuentes de alimento disponibles involucrando a un gran número de individuos, gracias a su rápida propagación mediada por contactos trofalácticos y a su persistencia informativa a escala colectiva (Corti Bielsa, 2015), permitiendo optimizar el desempeño de la colonia como un todo durante la búsqueda y explotación de recursos.

#### **1.4 Ecología cognitiva de *Apis mellifera***

El estudio del comportamiento recolector de las abejas melíferas puede abordarse desde la ecología cognitiva. Esta disciplina se centra en el estudio de los procesos cognitivos para explicar patrones generales de comportamiento que afectan las interacciones ecológicas (Dukas, 1998). Al considerar los mecanismos que subyacen en la adquisición y manipulación de la información, intenta comprender

los procesos de toma de decisiones que determinan el comportamiento a nivel individual y los patrones generales de interacciones intra e interespecíficas. Específicamente en el contexto de la ecología de la polinización, la incorporación de los procesos cognitivos en los estudios del comportamiento de los polinizadores contribuye a una mejor comprensión de las interacciones planta-polinizador (Chittka y Thomson, 2001).

El comportamiento de búsqueda y recolección de alimento de las abejas melíferas está determinado por sus habilidades perceptuales y cognitivas para reconocer nuevas fuentes de alimentos, evaluar su productividad y aprender claves visuales y olfativas que les permiten orientarse y volver a visitar a las fuentes más ricas en los sucesivos vuelos de recolección. Dichos procesos cognitivos requieren la integración de distintas modalidades sensoriales (visual, olfativa, gustativa, entre otras) para formar memorias que guiarán el comportamiento recolector y la toma de decisiones en un ambiente con recursos cambiantes. Las claves olfativas resultan particularmente importantes dado que las abejas aprenden los olores de las flores que visitan y pueden asociarlos a la recompensa de néctar obtenida (von Frisch, 1923, 1967; Menzel, 1985; Seeley, 1995). Por otra parte, la formación de las memorias olfativas es un proceso dinámico, y mientras aquellas de corto término se mantienen activas por períodos de tiempo del orden de segundos o minutos, las memorias de mediano y largo término persisten durante varias horas, días e incluso meses (Menzel, 1999).

Dada la importancia de la percepción olfativa en los insectos polinizadores, la inclusión de la química floral en el estudio de las interacciones planta-polinizador permitiría comprender mejor el comportamiento de los polinizadores, así como las implicancias ecológicas y también agronómicas, en el caso de sistemas agrícolas. Los perfiles químicos de las flores incluyen diversos compuestos volátiles y no volátiles presentes en el néctar y el polen, además de los azúcares y otros nutrientes que influyen en la atracción de polinizadores e indirectamente contribuyen a la polinización (Dobson, 2006; Raguso, 2008). A su vez las capacidades cognitivas de los polinizadores para integrar diferentes modalidades sensoriales resultan de suma relevancia durante la búsqueda y recolección de recursos, ya que las flores producen múltiples señales (olfativas, visuales, gustativas) que pueden ser honestas o deshonestas, sinérgicas o redundantes para los polinizadores (Raguso, 2004, 2008).

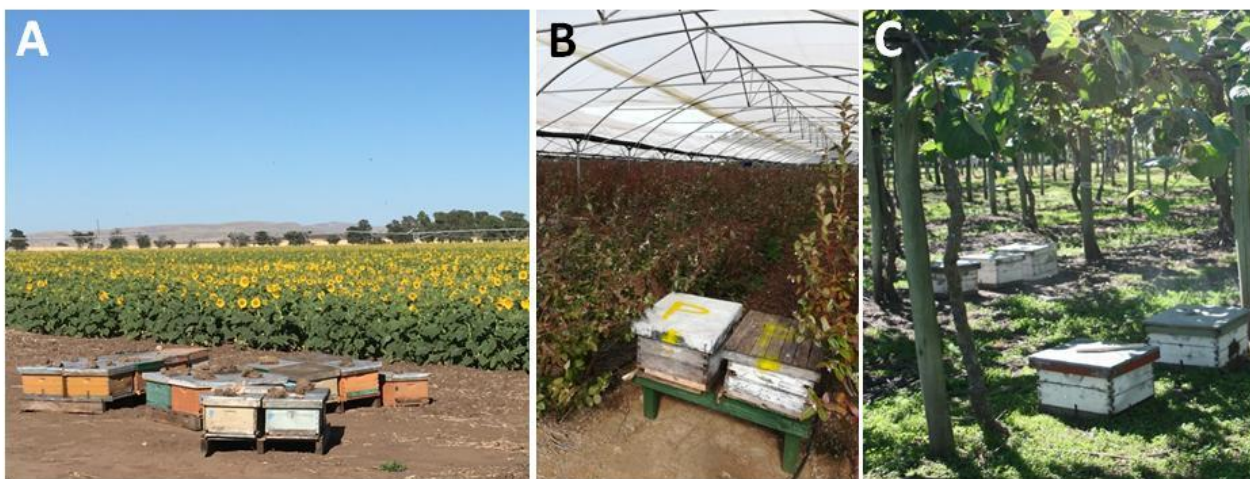
Si bien numerosos estudios han abordado las habilidades cognitivas de las abejas en condiciones controladas de laboratorio (Menzel, 1999; Giurfa, 2007), son menos frecuentes los estudios en condiciones naturales o semi-naturales (Gerber *et al.*, 1996; Díaz, P.C. *et al.*, 2013; Susic Martin y Farina, 2016). En dichos ambientes las floraciones se suceden en el tiempo y en el espacio con mayor o menor grado de solapamiento y proveen de un escenario propicio para el estudio de la plasticidad de

las preferencias de las abejas recolectoras. Al estudiar el comportamiento recolector de las abejas y la dinámica de las memorias olfativas en un cultivo mixto de perales y manzanos cuyas floraciones se solapan con cierto desfase temporal, se observan diferencias en los recursos explotados en cada especie (polen en flores de perales y néctar en flores de manzanos) con un máximo de recolección de polen y de néctar en el momento de máxima floración de los perales y manzanos, respectivamente (Díaz, P.C. *et al.*, 2013). Este patrón de comportamiento se corresponde con diferencias en la respuesta de extensión de probóscide a las fragancias florales evaluada en distintos momentos de la floración, lo cual sugiere que las abejas establecen memorias específicas para cada cultivo y que las respuestas son moduladas de acuerdo a las fluctuaciones de los recursos disponibles en el ambiente (Díaz, P.C. *et al.*, 2013).

En este contexto, considerar los distintos procesos cognitivos involucrados en los cambios del comportamiento recolector de las abejas melíferas, como por ejemplo el aprendizaje de claves olfativas, la transferencia de información dentro de la colonia, la dinámica temporal de las memorias olfativas, la constancia floral y la toma de decisiones en el contexto recolector, permitirían comprender los cambios de comportamiento en distintos escenarios y plantear estrategias que permitan mejorar el comportamiento recolector de colmenas utilizadas para brindar servicios de polinización.

## **1.5 Servicios de polinización de cultivos mediados por colmenas de *Apis mellifera***

Los servicios de polinización son servicios ecosistémicos de relevancia tanto para la producción de alimentos como para la conservación de especies no cultivadas, y también se ha reconocido su valor en términos socioculturales (IPBES, 2016). La distribución y adaptabilidad de las abejas melíferas a distintas regiones del mundo, su amplia dieta generalista y su capacidad de cubrir grandes áreas de vuelo, sumado a una larga tradición de apicultura como actividad humana y a la posibilidad de trasladar colmenas entre distintos cultivos, han convertido a esta especie en el principal polinizador manejado en sistemas agrícolas (McGregor, 1976; Klein *et al.*, 2007). El manejo de colmenas para brindar servicios de polinización, también conocido como polinización dirigida, ha crecido sosteniblemente en las últimas décadas y la producción de muchos cultivos de alto valor económico depende de la contratación de colmenas trashumantes (Figura 1.3); siendo el caso más impactante el cultivo de almendros en California, que implica el traslado de más de un millón de colmenas cada año provenientes de todas las regiones de E.E.U.U. (Goodrich *et al.*, 2019).

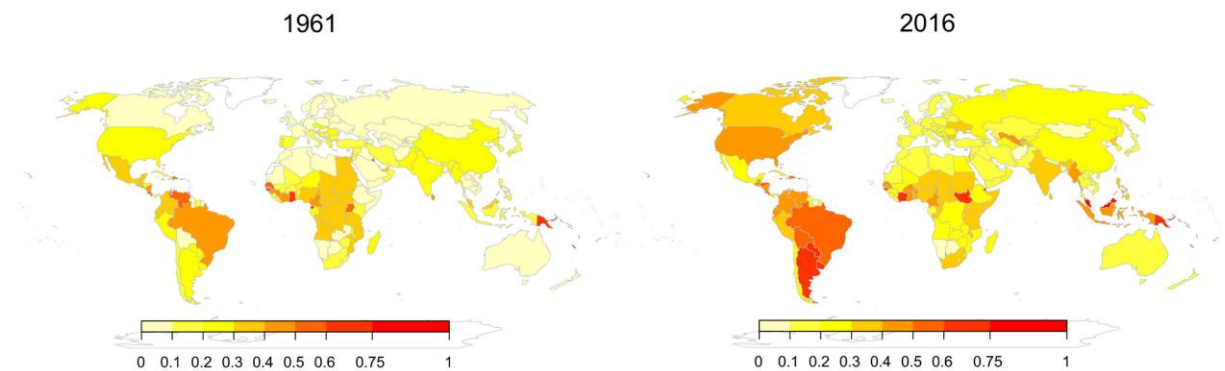


**Figura 1.3. Servicios de polinización brindados por colmenas trashumantes de abejas melíferas en cultivos de girasol (A), arándano (B) y kiwi (C).** Crédito fotográfico: INSSOC.

La polinización, que es la transferencia de polen desde las anteras hasta el estigma de flores de la misma especie, está mediada por animales en la gran mayoría de las angiospermas, especialmente insectos (polinización entomófila) y en particular por abejas (Tepedino, 1979; Kearns *et al.*, 1998; Abrol, 2012). Aunque la polinización entomófila es irrelevante para una gran parte de cultivos tales como los cereales o la caña de azúcar, se ha estimado que el 35% de la producción global de alimentos depende de polinizadores (Klein *et al.*, 2007). Al estimar el grado de dependencia de polinizadores, se encontró evidencia de un incremento de la producción en 92 de 108 cultivos evaluados, y en 13 de dichos casos (como por ejemplo, melón, cacao o calabaza) la exclusión de polinizadores resultó en una reducción de al menos 90% de su producción. Cultivos como la soja o el algodón presentaron una dependencia moderada (reducción de la producción de 10-39% sin polinizadores) mientras que diversos frutales tales como almendros, perales y manzanos, mostraron una dependencia alta (reducción del 40-89%). Cabe mencionar que en dicho trabajo sólo se consideraron cultivos para la producción de frutos o semillas de consumo humano directo, y no se incluyeron cultivos para la producción de semillas híbridas ni cultivos de forraje, por lo que la contribución de los polinizadores a la producción de alimentos es aún mayor.

Por otra parte, las tierras agrícolas destinadas a cultivos dependientes de polinizadores están en continua expansión en todo el mundo, aumentando un 137% en el período 1961-2016 (Aizen *et al.*, 2019; Figura 1.4). Esta tendencia global se refleja en los países de Sudamérica y, en particular, en Argentina, donde el incremento resultó ser de 142% y 178%, respectivamente. No obstante la creciente demanda de servicios de polinización, el stock mundial de colmenas ha crecido a un ritmo más lento y no alcanza a cubrir las necesidades actuales (Aizen y Harder, 2009; Breeze *et al.*, 2014). Asimismo, en el hemisferio norte se han reportado graves pérdidas de colmenas de abejas melíferas:

del 59% en EEUU para el período 1947-2005 y del 25% en Europa central para el período 1985-2005 (Potts *et al.*, 2010). En Latinoamérica la primera encuesta para el monitoreo de pérdida de colmenas reportó una pérdida anual entre un 25% y 50% en Colombia, Brasil, Chile, Argentina y Bolivia para el período 2016-18 (Solatina, 2020). Entre las potenciales causas de dichas pérdidas se proponen: el cambio en el uso de la tierra el cual causa pérdida y fragmentación de hábitats, el aumento en el uso de agroquímicos, la disminución de la diversidad de recursos alimenticios y la propagación de patógenos (Potts *et al.* 2010; IPBES, 2016).



**Figura 1.4 Mapas mundiales de la dependencia de la agricultura de polinizadores en 1961 y 2016.** Los colores indican la proporción de la superficie total destinada a cultivos agrícolas dependientes de polinizadores en cada año. (Adaptado de Aizen *et al.*, 2019).

A pesar de su rol dominante en la polinización en sistemas agrícolas, las abejas *Apis mellifera* no son los polinizadores más eficientes a nivel individual frente a polinizadores nativos en ciertos cultivos (McGregor, 1976; Delaplane y Mayer, 2000; Klein *et al.*, 2007). Por un lado, su alta constancia floral puede dificultar la polinización en cultivos con un marcado dimorfismo sexual como el girasol para la producción de semillas híbridas que depende de la polinización cruzada para la formación de semillas (Parker, 1981; DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000). En otros casos como por ejemplo el arándano, las flores que poseen anteras poricidas requieren de vibración ('buzz-pollination') para liberar grandes cantidades de polen, pero las abejas melíferas no son capaces de realizar este tipo de comportamiento y son consideradas polinizadores menos efectivos (Javorek *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2013). Por otro lado, en ciertos cultivos que poseen flores sin néctar, como el kiwi, la contribución de los insectos y del viento a la polinización está en discusión y muchos productores realizan prácticas de polinización manual para maximizar la producción de frutos (Costa *et al.*, 1993; Vaissière *et al.*, 1996). Las limitaciones que presentan las abejas melíferas frente a otros polinizadores en los cultivos

mencionados han llevado a estudiar la contribución de especies de abejas nativas en sistemas agrícolas.

### 1.5.1 Polinizadores no-*Apis*

Aun cuando *Apis mellifera* es el polinizador económicamente más importante, existen más de 20.000 especies conocidas de abejas, con alrededor de 350 géneros y por lo menos 5.000 especies en la región Neotropical (Michener, 2000; Fernández y Sharkey, 2006). En la Argentina, se han reconocido unas 1.100 especies de abejas silvestres nativas y al menos siete especies exóticas, introducidas accidentalmente o en algunos casos como polinizadores para ciertos cultivos (Roig-Alsina, 2008).

La contribución de insectos silvestres a la polinización ha sido documentada para una amplia variedad de cultivos, incluyendo especies anuales y perennes de frutales, oleaginosas y estimulantes (Garibaldi *et al.*, 2013; Mallinger y Graton, 2015; Rader *et al.*, 2016). En 32 agroecosistemas evaluados se encontró un efecto positivo de las visitas de insectos silvestres en la proporción de frutos maduros obtenidos, mientras que las visitas de abejas melíferas tuvieron un efecto positivo en sólo el 14% de los sistemas (Garibaldi *et al.*, 2013). Más aún, distintas especies de polinizadores pueden manipular los recursos florales de manera diferente, presentando rasgos funcionales complementarios que se correlacionan con incrementos en los rendimientos de cultivos (Hoehn *et al.*, 2008). Sin embargo, la diversidad de los ensambles de polinizadores silvestres puede variar considerablemente en las distintas regiones geográficas, y por otro lado, su abundancia suele estar disminuida debido a la intensificación agrícola y a la fragmentación de hábitats, lo cual implica la pérdida de ambientes naturales que ofrecen tanto sitios de nidificación como recursos alimenticios (Kremen *et al.*, 2002; Medan *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2012). Otros factores adicionales que afectan la abundancia de polinizadores silvestres son el manejo sanitario de polinizadores comerciales que puede favorecer la transmisión de patógenos, y la introducción de especies exóticas invasoras que desplazan poblaciones nativas (Vanberger y the Insect Pollinators Initiative, 2013; Potts *et al.*, 2016).

En este contexto, si bien los productores contratan principalmente colmenas trashumantes de *Apis mellifera* para servicios de polinización en cultivos, en las últimas décadas ha crecido el interés en el manejo de polinizadores alternativos, como por ejemplo abejas de los géneros *Osmia*, *Bombus*, *Megachile* y *Xylocopa* (Mader *et al.*, 2010; Roubik, 2018a; Osterman *et al.*, 2021). Los abejorros *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae), en particular, son eficientes polinizadores de cultivos de invernadero, como el tomate, el pimiento, la frutilla, pero también en cultivos abiertos como la



manzana, el almendro, el arándano y el kiwi (Stubbs y Drummond, 2001; Thomson y Goodell, 2001; Pomeroy y Fisher, 2002; Aldana *et al.*, 2007; Riano *et al.*, 2015). Debido a esto, algunas especies de abejorros (principalmente, *B. impatiens* y *B. terrestris*) se crían artificialmente y se comercializan en distintos países (Velthuis y van Doorn, 2006), y en Argentina desde hace algunos años se comercializa la especie nativa *Bombus pauloensis* Friese.

En cuanto a la constancia floral, este comportamiento es común en otros insectos sociales como los abejorros del género *Bombus*, los cuales son también insectos ampliamente poliléticos (Free, 1963, 1970; Chittka *et al.*, 1997). En comparación con las abejas melíferas, los abejorros muestran una menor constancia floral al recolectar polen. Sin embargo, esto puede variar considerablemente entre distintas especies de abejorros: mientras el 66% de las cargas de polen recolectadas por *B. lucorum* Linnaeus pertenecían a una sola especie, sólo el 37% de las cargas de *B. pascuorum* Scopoli (= *B. agrorum* L.) contenían un solo tipo de polen (Free, 1970). Asimismo, dos colonias de *B. lucorum* explotaron distintos recursos florales en un mismo entorno y período de tiempo, lo cual indica que la constancia floral de las recolectoras se ve influenciada no sólo por los recursos disponibles, sino también por aspectos relacionados a la colonia (Free, 1970). En el caso de las especies nativas de Sudamérica *B. pauloensis* y *B. bellicosus* Smith, ambas mostraron una constancia floral más alta, presentando un 80 y 84% de cargas de polen puras, respectivamente (Rossi *et al.*, 2015). Por otra parte, cabe mencionar que el comportamiento de constancia floral se diferencia de otros tipos de preferencias fijas, como aquellas que presentan las abejas solitarias oligoléticas, que se especializan en recolectar polen de unos pocos tipos florales, pertenecientes a la misma familia o a familias emparentadas (Grant, 1950; Faegri y van der Pijl, 1979). Dicha preferencia es un atributo a nivel de la especie y no debe confundirse con la constancia floral que es un comportamiento individual, el cual evidencia una preferencia o especialización temporal. De todos modos, cobra importancia considerar las preferencias de distintas especies de polinizadores, ya que pueden limitar el rinde de cultivos que requieran polinización cruzada.

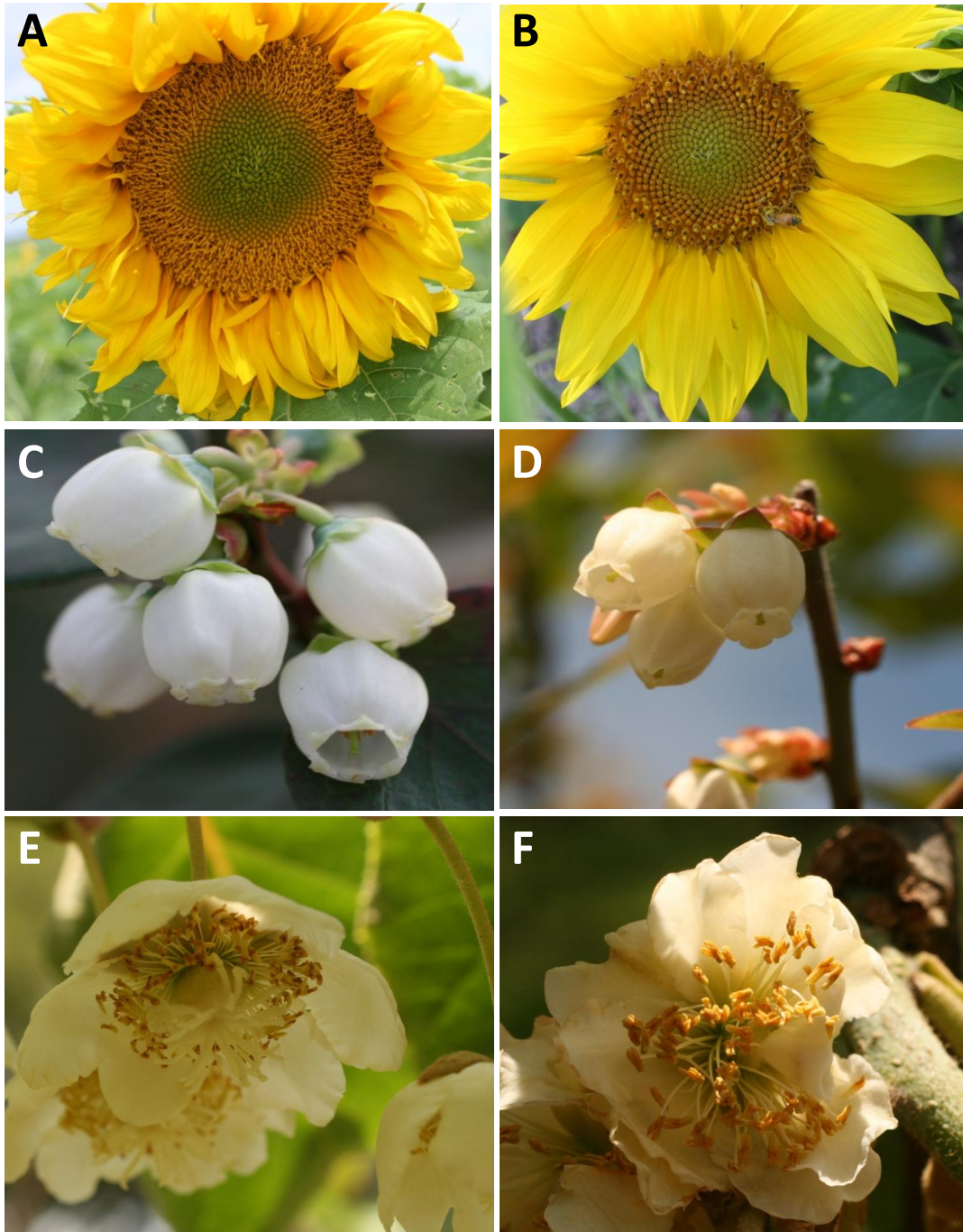
Teniendo en cuenta las particularidades de la biología de distintos polinizadores, una estrategia integrativa, que involucre tanto especies manejadas como silvestres que pueden presentar rasgos funcionales complementarios a los de las abejas melíferas, puede mejorar los servicios de polinización en entornos agrícolas de manera directa en relación a los recursos recolectados y su comportamiento en las flores, y también de manera indirecta, al promover movimientos de las abejas melíferas entre flores y los cruzamientos entre cultivares (Carvalho *et al.*, 2011; Brittain *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2015; Koh *et al.*, 2018).

## 1.6 Cultivos dependientes del servicio de polinización

Como se mencionó previamente, el grado de dependencia de polinizadores de los diversos cultivos varía desde una nula o pequeña contribución de los polinizadores al rinde (en especies anemófilas) hasta una total dependencia (Klein *et al.*, 2007). Asimismo, en la mayoría de los cultivos con moderada o alta dependencia de polinizadores, la principal especie utilizada es la abeja melífera, a pesar de no ser la más eficiente en todos los casos. Por otro lado, los programas de selección de nuevas variedades genéticas de cultivos, rara vez contemplan caracteres ligados a la atracción de polinizadores como un factor relevante. En particular, los cultivos de girasol para la producción de semillas híbridas, arándano y kiwi presentan una alta dependencia de polinizadores y sus flores poseen características particulares que limitan la eficiencia polinizadora de las abejas melíferas (Figura 1.5). En un contexto de creciente demanda de servicios de polinización, estos cultivos proporcionan sistemas apropiados para el estudio del comportamiento de *A. mellifera* frente a otras especies nativas, con el fin de desarrollar estrategias que apunten a sesgar sus preferencias recolectoras y así mejorar el servicio de polinización dirigida.

### 1.6.1 Cultivos de girasol

El girasol *Helianthus annuus* Linnaeus (Asteraceae), nativo de Norteamérica, es cultivado en todo el mundo para la producción de aceite (cultivares aceiteros) o para el consumo directo de las semillas (cultivares confiteros), y presenta un grado variable de auto-compatibilidad y de dependencia polinizadores (DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000; DeGrandi-Hoffman y Chambers, 2006; Mallinger y Prasifka, 2017). Además de la producción para la obtención de aceite o para confituras, se cultivan variedades de girasol para la producción de semillas híbridas. Para maximizar la eficiencia de obtención de semilla, se utiliza el sistema de androesterilidad citoplasmática en las líneas utilizadas como hembras en los cruzamientos, originalmente desarrollado en el INRA de Francia por Leclercq (1969) y ampliamente difundido en todo el mundo. En este sistema los insectos polinizadores resultan esenciales para la transferencia de polen desde la línea restauradora o androfértil, llamada macho fértil (MF), a la línea androestéril, llamada macho estéril (ME). Ambos parentales se siembran en hileras alternadas, con una mayor cantidad de líneas ME (productoras de semillas) separadas por líneas MF (dadoras de polen). Otra característica de las plantas ME y MF es que presentan un grado variable de dimorfismo en los distintos cultivares, en caracteres como por ejemplo el diámetro del capítulo (Figura 1.5A, B), el cual también puede influir en el comportamiento de los polinizadores.



**Figura 1.5. Cultivos dependientes del servicio de polinización.** Girasol *Helianthus annuus* para la producción de semillas híbridas (**A**, inflorescencia macho estéril; **B**, inflorescencia macho fértil). Arándano de tipo 'Southern highbush' *Vaccinium corymbosum* (**C** cultivar Emerald; **D**, cultivar O'Neal). Kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (**E**, flor femenina; **F**, flor masculina). Crédito fotográfico: INSSOC.

Las abejas melíferas son el principal polinizador utilizado en el cultivo de girasol para la producción de semillas híbridas, con una densidad recomendada de 3 colmenas por hectárea (Delaplane y Mayer, 2000). Las abejas visitan las inflorescencias para recolectar néctar y polen, los cuales son ofrecidos de manera abundante. Sin embargo, este cultivo es también visitado por una gran diversidad de abejas silvestres, en especial en su área de distribución nativa, siendo comunes las abejas solitarias de los géneros *Melissodes*, *Andrena* y *Halictus*, algunas de ellas especialistas en girasol (Parker, 1981; DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000; Greenleaf y Kremen, 2006; Mallinger *et al.*, 2019). En plantaciones de Argentina, los elencos de visitantes florales incluyen entre las especies de abejas más capturadas aquellas pertenecientes a los géneros *Melissodes* y *Megachile* (Torretta *et al.*, 2010; Cilla *et al.*, 2012; Chamer *et al.*, 2020). Estudios tanto en cultivos comerciales de girasol como en híbridos para la producción de semillas muestran que la presencia de abejas nativas en el cultivo puede contribuir de manera indirecta a su polinización, al promover los movimientos de abejas melíferas entre inflorescencias de una hilera a otra alternando entre parentales (Greenleaf y Kremen, 2006; Carvalheiro *et al.*, 2011). Sin embargo, son escasos los estudios de las interacciones entre las abejas y otros polinizadores nativos en híbridos altamente dimórficos.

### **1.6.2 Cultivos de arándano**

El arándano de tipo ‘Southern Highbush’ *Vaccinium corymbosum* Linnaeus (Ericaceae) es un arbusto nativo del este de Norteamérica. Existen numerosos cultivares de arándano con un grado variable de autocompatibilidad y, por ende, de dependencia de polinizadores, aunque todos ellos se benefician de la polinización cruzada para una buena producción de frutos (MacKenzie, 1997; Delaplane y Mayer 2000; Klein *et al.* 2007; Isaacs y Kirk 2010).

Las flores de arándano se disponen en racimos generalmente axilares y poseen corolas blancas o rosadas de forma urceolada, con nectarios basales que ofrecen abundante néctar y las anteras presentan dehiscencia poricida, las cuales requieren de vibración (o ‘buzz-pollination’) para la liberación del polen (Figura 1.5C, D). Los diferentes cultivares presentan variadas morfologías florales y fenología (Ritzinger y Lyrene, 1999; Courcelles *et al.*, 2013), pudiendo afectar el comportamiento recolector de distintas especies polinizadores y, en consecuencia, el rinde del cultivo. Si bien muchas especies de abejas nativas presentes en el rango de distribución nativo son capaces de vibrar las anteras (Tuell *et al.*, 2009; Gibbs *et al.*, 2016), las abejas melíferas no realizan este tipo de comportamiento, recolectan principalmente néctar y son consideradas polinizadores menos efectivos de este tipo de flores (Javorek *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2013; Moquet *et al.*, 2017). Teniendo en

cuenta todos estos factores, los productores de arándano suelen contratar un alto número de colmenas de abejas melíferas, alcanzando una densidad de hasta 12 colmenas por hectárea (Isaacs y Kirk, 2010; Gibbs *et al.*, 2016).

Asimismo, frente a las limitaciones de las abejas melíferas en este cultivo y frente a la escasez de polinizadores silvestres durante la época de floración, se ha comenzado a utilizar al abejorro nativo *B. pauloensis* de manera comercial como polinizador alternativo del arándano (Carlazara *et al.*, 2013; Díaz, S.A. *et al.*, 2013; Cavigliasso *et al.*, 2020). Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen el efecto de suplementar el servicio de polinización de colmenas de abejas melíferas con otros polinizadores comerciales. Aunque se ha encontrado un efecto positivo de la introducción de colonias de *B. pauloensis* en la producción de frutos (Carlazara *et al.*, 2013; Díaz, S.A. *et al.*, 2013; Cavigliasso *et al.*, 2020), no se ha documentado el comportamiento de ambas especies en distintos cultivares considerando la variabilidad en la morfología floral y en la recompensa de néctar.

### 1.6.3 Cultivos de kiwi

El kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev., antes conocida como *A. deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang y A. R. Ferguson (Actinidiaceae) es una planta trepadora nativa de China, introducida en Nueva Zelanda a comienzos del siglo XX y actualmente cultivada en distintas regiones templadas del mundo (Ferguson, 1984, 2016). El kiwi es una especie funcionalmente dioica, con plantas femeninas que presentan flores pistiladas (o femeninas) y plantas masculinas que presentan flores estaminadas (o masculinas) (Figura 1.5E, F). Se trata de un cultivo con alta dependencia de polinizadores (Klein *et al.*, 2007), aunque, como ya se ha mencionado, el rol del viento en la polinización está en discusión (Costa *et al.*, 1993; Vaissière *et al.*, 1996). Mientras que las flores femeninas poseen un ovario y estilos bien desarrollados, las flores masculinas presentan un ovario atrofiado y estilos rudimentarios. Ambos tipos de flores presentan numerosos estambres que producen gran cantidad de polen pero no ofrecen néctar como recompensa. Como otras especies de *Actinidia*, el kiwi podría considerarse como una especie crípticamente dioica (Kawagoe y Suzuki, 2004; Ferguson, 2016), dado que el polen de flores femeninas no es viable (pseudopolen) y no tendría valor nutricional aunque es recolectado por los visitantes florales (Schmid, 1978). Además, para la obtención de frutos comercializables (>70 g) las flores femeninas deben recibir una suficiente cantidad de polen viable compatible y producir varios cientos de semillas (Testolin, 1991), por lo que es frecuente que los productores realicen prácticas de polinización manual al final de la floración con el objetivo de maximizar el rinde del cultivo.

Con el fin de promover la polinización cruzada, se utilizan distintos esquemas de distribución de los cultivares dadores de polen (entre 1:3 y 1:8 plantas masculinas:femeninas; Goodwin, 1999), incluyendo muchas veces dos o más cultivares masculinos de floración solapada (Costa *et al.*, 1993; Vaissière *et al.*, 1996; Goodwin *et al.*, 1999). Por otra parte, se han reportado diferencias en la atracción de ambos tipos florales para las abejas melíferas, que podrían deberse a pequeñas diferencias en su morfología, su fragancia y la coloración del polen (Palmer-Jones y Clinch, 1974; Jay y Jay, 1984; Goodwin y Steven, 1993). Asimismo, las flores de kiwi pueden resultar menos atractivas para las abejas frente a flora competitiva (como el trébol blanco u otras especies), ya que las flores de kiwi no ofrecen néctar y su polen, si bien es abundante, al perder humedad durante el día resulta más difícil de recolectar para las abejas (Palmer-Jones y Clinch, 1974; Clinch, 1984; Jay y Jay, 1984). Estos factores limitarían la eficiencia polinizadora de *A. mellifera* en este cultivo, por lo que los productores suelen contratar un alto número de colmenas (siendo la densidad recomendada de 8 colmenas por hectárea; Palmer-Jones y Clinch, 1974) además de realizar prácticas de polinización artificial.

El éxito en la polinización de las flores de kiwi depende de varios factores, entre ellos la distribución de los cultivares dadores de polen y femeninos en la plantación, la remoción de flora alternativa competitiva que resulte atractiva para las abejas, la densidad de colmenas de abejas melíferas y el momento de su introducción en el cultivo, y la práctica de suplementación con polinización artificial (Ferguson, 1984; Costa *et al.*, 1993; Vaissière *et al.*, 1996; Howpage *et al.*, 2001). La presencia de polinizadores silvestres visitando flores de kiwi es frecuente en Nueva Zelanda, donde se han reportado más 150 especies de insectos (Macfarlane y Ferguson, 1983). Sin embargo, en otros estudios se reporta una baja diversidad de visitantes (Palmer-Jones y Clinch, 1974; Testolin *et al.*, 1991), lo cual denota la variabilidad entre distintos ambientes agrícolas. Más aún, es esperable que las poblaciones de polinizadores silvestres hayan disminuido en los últimos años debido a la intensificación agrícola (IPBES, 2016). En este contexto y teniendo en cuenta el alto número de visitas requeridas para una polinización exitosa, una mayor comprensión del comportamiento de las abejas melíferas en ambos tipos de flores, considerando las diferencias de distintos cultivares en la atracción de polinizadores, permitiría desarrollar estrategias de manejo para dirigir su comportamiento hacia el cultivo e incrementar su eficiencia polinizadora.

## **1.7 Desarrollo de herramientas para influenciar el comportamiento recolector de *Apis mellifera***

Cientos de colmenas trashumantes de abejas melíferas son trasladadas de un campo a otro siguiendo la floración de cultivos para brindar servicios de polinización. Al cambiar de entorno, las abejas deben ajustar sus estrategias de recolección pasando de uno familiar a uno novedoso, lo cual en la práctica implica un tiempo de reconocimiento del nuevo ambiente y un retardo en visitar el cultivo de interés. Además, en algunos ecosistemas agrícolas las abejas melíferas pueden resultar menos eficientes que otras especies de polinizadores nativos. Teniendo en cuenta además la creciente demanda por servicios de polinización, resulta relevante pensar en herramientas que puedan influenciar el comportamiento recolector de las abejas melíferas.

En décadas pasadas se han probado distintas estrategias para atraer a las abejas al cultivo como la aplicación de azúcares, aceites o feromonas sobre las flores y el follaje, con resultados ambiguos que no incrementaron la polinización del cultivo. La aplicación de jarabe azucarado en el cultivo disminuyó la recolección de néctar y polen en las flores de interés, y resultó en una menor producción de frutos en las parcelas tratadas (Free, 1965). Por otra parte, la utilización de productos comerciales basados en feromonas, como por ejemplo Beescent® o Pollinus®, no resultaron eficaces en todos los casos y aunque pueden incrementar las visitas de las abejas, no necesariamente aumentan la polinización del cultivo (Loper, 1992; Schultheis *et al.*, 1994; Delaplane y Mayer, 2000; Przybylska *et al.*, 2021). La discrepancia entre los resultados observados para estos productos puede deberse a su falta de especificidad para cada cultivo, y en el caso de feromonas, éstas son sustancias químicas que si bien son atrayentes evocan respuestas innatas que pueden no estar relacionadas con la recolección de recursos y que no suelen tener un efecto prolongado en el tiempo debido a su volatilidad (Loper, 1992; Currie *et al.*, 1992).

Por otro lado, intentos previos de sesgar las preferencias de las abejas melíferas mediante el contacto con néctar aromatizado dentro de la colmena reportaron resultados dispares, sin documentar efectos en el rinde de los cultivos (von Frisch, 1923, 1943, 1967; Free, 1958). La circulación de néctar aromatizado dentro de la colmena es suficiente para que dichos olores sean aprendidos por otras compañeras del nido y así aumentar el reclutamiento hacia una fuente de alimento específica (von Frisch, 1967). Dicho aprendizaje olfativo dentro de la colmena afecta no sólo la elección de olores florales en bioensayos de laboratorio (Farina *et al.*, 2005, 2007), sino también las respuestas operantes en el exterior (Arenas *et al.*, 2007, 2008; Balbuena *et al.*, 2012a, 2012b). Más aún, las memorias olfativas así establecidas pueden persistir varios días (Farina *et al.*, 2005; Arenas *et al.*, 2008; Grüter *et al.*, 2009; Balbuena *et al.*, 2012a).

A partir de estos resultados y con el objetivo de sesgar el comportamiento recolector de las abejas melíferas de manera dirigida y como consecuencia incrementar su eficiencia de polinización, en el Laboratorio de Insectos Sociales se realizaron estudios para desarrollar formulaciones sintéticas que representan una versión simplificada de las fragancias florales de algunas especies con interés agrícola. Hasta el momento se han desarrollado formulados sintéticos para los cultivos de girasol, manzano, peral y almendro (Farina *et al.*, 2011, 2017, 2018; Farina y Díaz, 2018). En resumen, la tecnología desarrollada se basa en que las abejas al generalizar una fragancia sintética con la fragancia natural de la flor del cultivo, muestran una menor demora para iniciar la recolección en el nuevo entorno agrícola, una mayor densidad en el cultivo de interés, un crecimiento poblacional más rápido de las colmenas tratadas y, como consecuencia, un aumento en la actividad recolectora y polinizadora. Esto se traduce en incrementos significativos de los rindes de los cultivos que en promedio son mayores al 20% (Díaz, 2013; Susic Martin, 2015; Farina y Díaz, 2018; Farina *et al.*, 2018, 2020).

## **1.8 Objetivos**

El objetivo general de este trabajo es comparar el comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* con otros polinizadores nativos en distintos cultivos agrícolas que requieren polinización entomófila y cuyas características particulares limitan la eficiencia polinizadora de las abejas melíferas, tales como dimorfismo parental o morfología floral restrictiva desde una aproximación que combine aspectos ecológicos y comportamentales del polinizador y ecofisiológicos del cultivo a polinizar. A su vez, con el objetivo de incrementar su eficiencia polinizadora en cultivos específicos y teniendo en cuenta las habilidades cognitivas de las abejas melíferas para generalizar y discriminar fragancias florales y así ajustar sus estrategias de recolección de recursos en base a memorias olfativas, se plantea desarrollar herramientas que puedan influenciar su comportamiento recolector a partir de los perfiles de los volátiles florales de dos cultivos de interés.

### **1.8.1 Objetivos particulares e hipótesis:**

- 1.1 Dado que el cultivo de girasol (*Helianthus annuus*) para la producción de semillas híbridas depende de la transferencia de polen de la línea parental dadora de polen (macho fértil, MF) a la línea parental productora de semillas (macho estéril, ME), la cual puede ser llevada a cabo



por abejas melíferas introducidas para brindar servicios de polinización y por abejas nativas silvestres, se plantea comparar el comportamiento recolector de ambos polinizadores, en términos de recursos recolectados y número de inflorescencias visitadas en cada parental, así como las interacciones inter- e intraespecíficas. Se espera que las abejas sociales y solitarias recolecten los recursos ofrecidos por cada parental (néctar y/o polen) de manera diferencial, encontrando un mayor número de abejas solitarias, las cuales recolectan ambos recursos en un mismo vuelo recolector, en la línea MF.

1.2 Dado que la polinización depende de las visitas de abejas que alternen entre parentales, se propone evaluar la constancia floral de abejas melíferas y abejas solitarias a lo largo de cada parental en un híbrido con marcado dimorfismo. En este caso, se espera que las abejas presenten una alta constancia floral con un bajo número de vuelos cruzados entre líneas MF y ME, y que la interacción con un segundo visitante floral propicie el cruzamiento entre parentales.

2. Dada la variabilidad en la morfología floral de distintos cultivares de arándano *Vaccinium corymbosum*, la cual restringe el acceso de los polinizadores al néctar y al polen, se propone comparar el comportamiento recolector, a nivel individual y de población, de los abejorros nativos *Bombus pauloensis* y de *Apis mellifera* introducidos en el cultivo para brindar servicios de polinización. Particularmente, se plantea caracterizar dos cultivares de similar fenología pero distinta morfología floral, evaluar la densidad de polinizadores en el cultivo y realizar seguimientos y capturas de las recolectoras de ambas especies en cada cultivar. Se plantea como hipótesis que a nivel individual *Bombus pauloensis* se diferencia de *Apis mellifera*, en términos de una mayor recolección de polen a lo largo de día, un mayor número de flores visitadas por unidad de tiempo y una mayor carga de polen de arándano en su cuerpo. Además, se plantea que a nivel poblacional un mayor número de *Apis mellifera* visiten el cultivo.

3.1 Dadas las limitaciones de *Apis mellifera* para la polinización eficiente de los cultivos de arándano y de kiwi, se plantea desarrollar formulados sintéticos específicos a partir de unos pocos compuestos volátiles florales de arándano y de kiwi, que funcionen como un estímulo condicionado para las abejas en un contexto de aprendizaje apetitivo del tipo olfativo y social dentro de la colmena. Para ello, se determinarán los volátiles presentes en las flores de ambos cultivos, y en base a éstos se evaluarán distintas mezclas candidatas que serán puestas a prueba en condicionamientos olfativos. Se postula que las abejas condicionadas en ensayos de laboratorio bajo el paradigma de REP al formulado sintético no son capaces de discriminar en sus respuestas entre el olor natural floral y la mezcla sintética que mejor lo representa.

3.2 Dado que la circulación de néctar aromatizado dentro de la colmena es suficiente para que dichos olores sean aprendidos por otras compañeras de nido y así sesgar el comportamiento recolector hacia una fuente de alimento específica, se propone evaluar el efecto de la estimulación olfativa con el formulado sintético seleccionado para cada cultivo en ensayos de campo. Se espera que las abejas de colmenas tratadas con el formulado sintético específico muestren un sesgo de actividad recolectora hacia el cultivo de interés, en términos de actividad general de la colmena, recolección de polen, y desarrollo del área de cría y de reservas de las colmenas, lo cual genera un incremento en el rinde.

## Comportamiento recolector de *Apis mellifera* y de abejas solitarias nativas en cultivos de girasol para la producción de semillas híbridas

### 2.1 Introducción

La abeja *Apis mellifera* es el principal polinizador utilizado en servicios de polinización de cultivos (McGregor, 1976; Klein *et al.*, 2007). Sin embargo, el rol de los polinizadores silvestres ha sido reconocido en las últimas décadas, documentándose un incremento de la producción de una amplia variedad de cultivos al aumentar la diversidad y frecuencia de visitas de insectos, en particular de abejas nativas solitarias (Garibaldi *et al.*, 2013; Mallinger y Graton, 2015; Rader *et al.*, 2016). Más aún, Brosi y Briggs (2013) demostraron que los roles funcionales que cumplen distintas especies en un ecosistema son dinámicos y pueden moldearse a través de las interacciones interespecíficas. Dichos autores muestran que la pérdida de una única especie puede reducir la fidelidad floral de otros polinizadores, con serias implicancias para el ecosistema en términos de una menor reproducción de las plantas, aún cuando otras especies de polinizadores potencialmente eficientes estuvieran presentes en el sistema.

El girasol (*Helianthus annuus*) es cultivado en todo el mundo para la producción de aceite (cultivares aceiteros) o para el consumo directo de las semillas (cultivares confiteros). En Argentina, la producción de girasol es de gran importancia, y se ha mantenido estable en un promedio anual de 3,4 millones de toneladas para el período 2015-2019, aportando un 7% de la producción mundial en el año 2019 (FAOSTAT, 2021). Aunque este cultivo presenta un grado variable de dependencia de polinizadores (DeGrandi-Hoffman, 2000, 2006; Mallinger y Prasifka, 2017), la dependencia es total en el caso de los cultivares seleccionados para la producción de semillas híbridas, en los que las abejas, ya sea introducidas o silvestres, resultan vectores esenciales para la transferencia de polen desde la línea restauradora o androfértil (llamada macho fértil, MF) hacia la línea androestéril (llamada macho estéril, ME). Ambas líneas parentales se siembran en bloques de hileras alternadas, con un mayor número de

líneas ME (productoras de semillas) que de líneas MF (dadoras de polen). En estos sistemas agrícolas, se ha visto que las abejas melíferas portaban más granos de polen de girasol adheridos en su cuerpo en aquellas plantaciones en las que existía una mayor abundancia de abejas silvestres nativas (DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000), sugiriendo que la eficiencia polinizadora de *A. mellifera* puede verse incrementada ante la presencia de abejas no-*Apis*. Estudios posteriores, llevados a cabo en plantaciones de cultivares comerciales y de cultivares para la producción de semillas híbridas, demostraron que las abejas no-*Apis* pueden contribuir de manera indirecta a la polinización del cultivo al promover los entrecruzamientos de las abejas melíferas entre líneas parentales como resultado de sus interacciones (Greenleaf y Kremen, 2006; Carvalheiro *et al.*, 2011). Dichas interacciones interespecíficas, al alterar el comportamiento recolector de *A. mellifera*, pueden facilitar la transferencia de polen desde inflorescencias MF a ME y así tener un efecto positivo en la polinización del cultivo.

Las inflorescencias de girasol ofrecen abundante polen y néctar y son visitadas por una gran diversidad de abejas silvestres, en especial en su área de distribución nativa, siendo comunes las abejas solitarias de los géneros *Melissodes*, *Andrena* y *Halictus*, algunas de ellas especialistas en este cultivo (Parker, 1981; DeGrandi-Hoffman, 2000; Greenleaf y Kremen, 2006; Mallinger *et al.*, 2019). En plantaciones de Argentina, los elencos de visitantes florales incluyen entre las especies de abejas más capturadas aquellas pertenecientes al género *Melissodes* y *Megachile* (Torretta *et al.*, 2010; Cilla *et al.*, 2012; Chamer *et al.*, 2020). Las abejas solitarias suelen recolectar tanto néctar como polen en un mismo vuelo y visitan más frecuentemente inflorescencias MF que ME, aunque su distribución entre líneas parentales parece depender del esquema de plantación (proporción de líneas MF:ME) y del tamaño de las poblaciones de abejas no-*Apis* presentes en el sistema (DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000).

Además de la diversidad de la comunidad de polinizadores presentes en un sistema agrícola y del diseño de plantación de ambos parentales, otro factor que puede influenciar el comportamiento recolector de las abejas es la morfología floral, la cual puede variar entre los cultivares (Mallinger y Prasifka, 2017). Existe una amplia variedad de híbridos de girasol desarrollados mediante programas de mejora genética con el objetivo de buscar cultivares de alto rendimiento y alto contenido oleico (Fick y Miller, 1997). Como parte de la selección genética, se eligen ciertas características como la altura de la planta o el diámetro del capítulo asociadas con un buen crecimiento vegetativo, y que están correlacionadas con un alto rendimiento (Fick, 1978; Vear, 2016). Estos caracteres morfológicos pueden variar considerablemente entre parentales de ciertos cultivares, e influir en la atracción de polinizadores. De hecho, se ha encontrado que el grado de dimorfismo entre parentales puede modificar la constancia floral de *A. mellifera*, observándose una menor proporción de abejas

recolectoras alternando entre líneas MF y ME al aumentar el dimorfismo entre ambas para distintos híbridos de girasol (Susic Martin y Farina, 2016). En consecuencia, una mayor fidelidad de las abejas a una dada línea resultaría en una menor transferencia de polen entre parentales y, en última instancia, impactaría negativamente en el rendimiento del cultivo.

Si bien se ha documentado el beneficio de los polinizadores silvestres, incluyendo abejas *Melissodes* spp., para la polinización de cultivares confiteros de girasol (Mallinger *et al.*, 2018), tales variedades no implicaban dimorfismo parental. De hecho, no se han encontrado estudios previos que evalúen el comportamiento de polinizadores silvestres en cultivos dimórficos de girasol. Por otra parte, la diversidad y abundancia de los polinizadores silvestres suele verse disminuida en muchas regiones productivas debido a la intensificación agrícola y a la fragmentación de hábitats (Kremen *et al.*, 2002; Medan *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2012), lo cual podría también afectar la contribución de las abejas nativas a la polinización de este cultivo.

En este estudio, se propone evaluar el comportamiento recolector de abejas melíferas introducidas para brindar servicios de polinización y de abejas nativas silvestres (*Melissodes* spp.) en un cultivo de girasol para la producción de semillas híbridas. En una primera instancia, se plantea caracterizar el dimorfismo parental y estudiar la distribución espacial de ambos polinizadores en cada línea parental. Además, se plantea comparar el comportamiento recolector a escala individual en términos de número de inflorescencias visitadas, el tipo de recurso recolectado y la constancia floral en cada parental. También se consideró el efecto de las interacciones intra- e interespecíficas con un segundo visitante floral en el comportamiento recolector. Por último, se realizaron capturas de distintos taxones de polinizadores en inflorescencias ME para evaluar la presencia de polen de girasol en sus cuerpos y estimar la potencial transferencia de polen entre parentales.

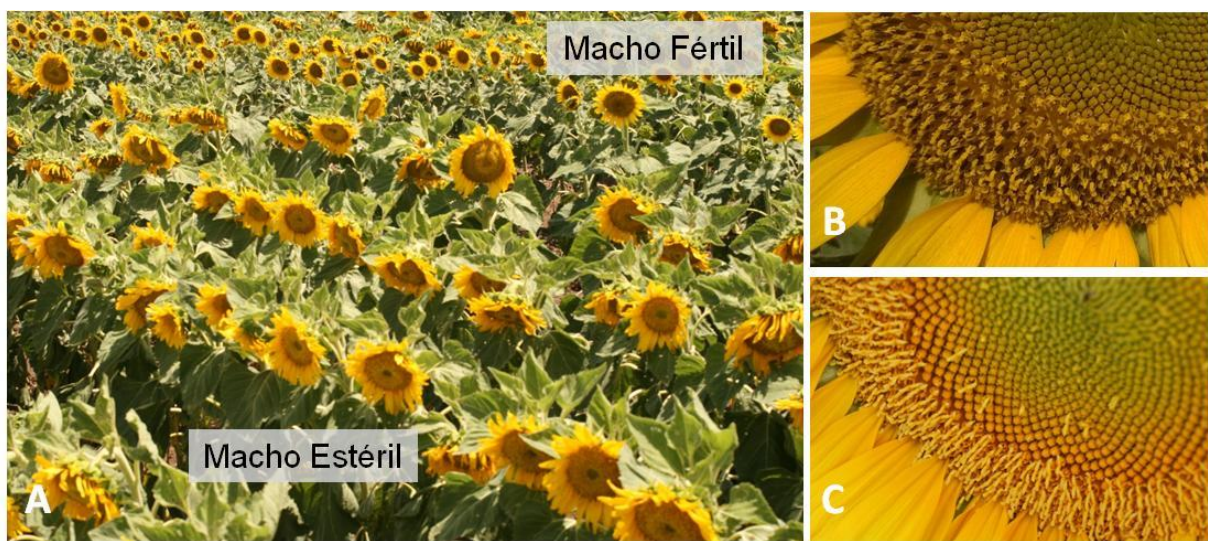
## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Sitio de estudio y animales**

Se realizaron ensayos de campo durante enero de 2017 en una plantación de girasol (*Helianthus annuus*) para la producción de semillas híbridas (cultivar aceitero) en el establecimiento La Emilia (37°58'31"S, 61°35'45"O), ubicado en la cercanía de la localidad de Coronel Suárez, en la provincia de Buenos Aires, Argentina. El lote seleccionado ocupaba una superficie de 55 ha en la que las líneas

parentales estaban sembradas en bloques alternados de 2 hileras MF cada 8 hileras ME, con una distancia entre hileras de 50 cm (Figura 2.1).

Para brindar servicio de polinización, se habían introducido un total de 166 colmenas de abejas *Apis mellifera* (con una población de alrededor de 20.000 obreras). Las mismas estaban dispuestas en 10 grupos de 12-24 colmenas cada uno en los bordes del cultivo, alcanzando una densidad de 3 colmenas/ha, que es la densidad recomendada para este tipo de cultivo (Gabai-Hazera *et al.*, 2018) (ver Anexo A Figura A1). Respecto de las abejas nativas *Melissodes* spp., el sitio de estudio se encontraba dentro de su distribución natural (Torretta *et al.*, 2010; Cilla *et al.*, 2012).



**Figura 2.1. Cultivo de girasol *Helianthus annuus* para la producción de semillas híbridas.** (A) Las líneas parentales del híbrido aceitero se sembraron alternando bloques de 2 hileras de macho fértil (MF), cuyas inflorescencias eran más pequeñas, cada 8 hileras de macho estéril (ME), cuyas inflorescencias eran de mayor tamaño. Detalle de inflorescencias MF (B), cuyas flores ofrecen polen y néctar, y ME (C), cuyas flores no ofrecen polen. Crédito fotográfico: INSSOC.

## 2.2.2 Caracterización de las líneas parentales

Con el objetivo de confirmar el dimorfismo entre ambas líneas parentales, se midieron dos caracteres: la altura de la planta y el diámetro del capítulo de 36 ejemplares ME y 35 plantas MF elegidas al azar. El diámetro del capítulo se midió de borde a borde del disco central en su parte más ancha, pasando por el centro de la inflorescencia (designada como unidad floral, UF, siguiendo la terminología de Vaissière *et al.*, 2011).

Por otra parte, se relevó el porcentaje de floración de cada línea parental, calculado a partir del número de UF abiertas (con al menos el 30% de las flores internas del disco en anthesis) en un cuadrante de 2 m<sup>2</sup> (N = entre 13 y 23 cuadrantes /parental durante tres días sucesivos) siguiendo el protocolo descrito por Vaissière y colaboradores (2011). Esta medición se realizó al mismo tiempo en que se registró la densidad de polinizadores en el cultivo, de manera de considerar la disponibilidad de recursos (néctar y polen).

En el sistema estudiado, las inflorescencias ME florecieron más tempranamente que las MF, de manera de garantizar la provisión de polen fresco durante toda la temporada. El relevamiento de la densidad de polinizadores en el cultivo se llevó a cabo con un nivel de floración de las líneas MF entre el 12 y 19%, y entre el 53 y 81% de floración de las líneas ME. Cabe mencionar que a pesar de no superar el 20% de floración durante el período de estudio, un total de 435 inflorescencias MF se encontraban en anthesis, proveyendo abundantes recursos florales para los visitantes florales presentes en el cultivo.

### **2.2.3 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp. en ambos parentales**

Primeramente, se registró el número e identidad de los visitantes diurnos de las inflorescencias de girasol por cada 100 UF abiertas (Vaissière *et al.*, 2011) a lo largo de transectas lineales durante tres días consecutivos (N = 48 transectas en líneas ME y N = 47 transectas en líneas MF). La determinación taxonómica de los visitantes fue realizada al menor nivel taxonómico posible, con especial foco en los himenópteros ápidos. Con el objetivo de identificar las abejas silvestres, se capturaron ejemplares para su posterior identificación y depósito en el Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN, Buenos Aires). Finalmente, dado que los principales visitantes florales fueron las abejas melíferas y abejas *Melissodes* spp., el análisis se centró en estos dos grupos, distinguiendo en el caso de abejas *Melissodes* entre machos y hembras.

### **2.2.4 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp. a escala individual**

#### **2.2.4.1 Número de inflorescencias visitadas y recursos recolectados**

Con el objetivo de estudiar el comportamiento recolector individual de *A. mellifera* y *Melissodes* spp., se monitorearon abejas durante sus sucesivas visitas florales desde el momento en que se posaban en una inflorescencia de girasol hasta que eran perdidas de vista. Se realizaron 61 seguimientos de *A. mellifera* y 57 de *Melissodes* spp. durante dos días consecutivos, registrando el número de flores visitadas, la duración de las visitas y el parental visitado.

Para evaluar diferencias en el uso de los recursos florales por cada grupo, registramos el tipo de recolectora (sólo néctar o polen) recolectado por cada individuo censado en transectas a lo largo de cada parental durante tres días consecutivos (N = 48 transectas en líneas ME y N = 47 transectas en líneas MF). Aquellas abejas portando carga de polen en sus patas traseras fueron consideradas como recolectoras de polen, mientras que aquellas que introducían la probóscide en la corola de una flor y sin carga de polen en sus patas traseras fueron consideradas como recolectoras de néctar. Las observaciones se realizaron tanto de mañana como de tarde (entre las 8:30 y las 12:00 hs, y entre las 14:30 y las 18:30 hs, respectivamente), de manera de considerar cualquier sesgo en la recolección de recursos a lo largo del día.



**Figura 2.2. Seguimiento de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp. visitando inflorescencias de girasol.** Aquellos individuos con la probóscide introducida en la corola, sin carga de polen en sus patas traseras, fueron considerados como recolectoras de néctar (**A**, *A. mellifera*), mientras que aquellos con carga de polen en sus patas traseras fueron categorizados como recolectoras de polen (**B** y **C**, la flecha señala la carga de polen). Crédito fotográfico: INSSOC.

#### **2.2.4.2 Constancia floral y potencial transferencia de polen entre parentales**

Dado que la producción de semillas híbridas de girasol depende de la transferencia de polen desde inflorescencias MF a inflorescencias ME, se evaluó la constancia floral de las recolectoras visitando líneas MF. Se siguió a los individuos durante sus sucesivas visitas hasta un tiempo máximo de 10



minutos, registrando si alternaban entre los parentales o no, de manera de calcular el porcentaje de recolectoras constantes en MF.

Para estimar el efecto de las interacciones con un segundo visitante floral, se siguió la metodología utilizada por Greenleaf y Kremen (2006). Se observó una abeja focal (*A. mellifera* o *Melissodes* spp.) recolectando en una inflorescencia de girasol durante un máximo de 10 minutos hasta que un segundo visitante (de cualquier especie) arribaba a la misma inflorescencia (N = 29 interacciones en MF; N = 12 interacciones en ME). Para cada observación, se registró la línea parental visitada, la identidad del segundo visitante y el comportamiento de la abeja focal, esto es si permanecía en el capítulo o si volaba a otra inflorescencia, distinguiendo en ese caso si cambiaba o si mantenía la línea parental. Aquellas observaciones en las que se producía el arribo de un tercer visitante o bien la abeja focal era perdida de vista al abandonar la inflorescencia inicial, fueron descartadas.

Por último, para estimar la potencial transferencia de polen mediada por los distintos grupos de visitantes florales a partir de la presencia de granos de polen de girasol adheridos en el cuerpo, se capturaron 100 visitantes florales en inflorescencias ME localizadas en hileras adyacentes a las líneas MF, o bien a dos, tres o cuatro hileras de distancia (a 50, 100, 150 y 200 cm, respectivamente, de la línea MF más cercana) (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993). Los ejemplares fueron capturados en viales individuales y congelados hasta su posterior examen. En el laboratorio, se observó la superficie del cuerpo de cada ejemplar bajo lupa (Leica MZ28) y se registró la presencia o ausencia de granos de polen de girasol. Luego se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos sobre la cual se puso en contacto el cuerpo de un visitante haciéndolo rodar de manera de embeber toda la superficie corporal. A continuación se colocó un cubreobjetos y se observó el preparado bajo microscopio (Labomed CXR III). La identidad de los granos de polen fue corroborada con preparados de referencia realizados a partir de las anteras de inflorescencias MF.

### **2.2.5 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa R v3.6.2 (R Core Team, 2019) y los paquetes glmmTMB (Brooks *et al.*, 2017) y nlme (Pinheiro *et al.*, 2019). Las diferencias en las variables morfológicas fueron evaluadas mediante dos modelos lineales generalizados (GLM). Para analizar la altura de la planta se planteó un modelo con estructura de error Gamma (con función de enlace logarítmica) considerando el parental como factor fijo (dos niveles). El diámetro del capítulo fue analizado con un modelo con estructura de error Gaussiana y parental como factor fijo. Debido a la

heterocedasticidad de los datos, se modeló la varianza mediante la función *varIdent* del paquete nlme. Para reducir el riesgo de cometer error de tipo I por el múltiple uso de los mismos datos, el nivel de significancia fue corregido usando el método de Bonferroni ( $\alpha' = \alpha/k$ ), con  $\alpha = 0,05$  y  $k = 2$ . De esta manera, el nuevo nivel de significancia que se tuvo en cuenta para el análisis de las variables morfológicas fue  $\alpha' = 0,025$ .

Para evaluar el número de abejas melíferas y *Melissodes* spp. en cada parental, se propuso un modelo lineal generalizado mixto (GLMM), con estructura de error Poisson. El modelo máximo incluyó la interacción entre visitante (tres niveles) y parental (dos niveles), el logaritmo del porcentaje de floración como offset (de manera de considerar el esfuerzo de muestreo), y la transecta como factor aleatorio. Se realizaron análisis *post hoc* utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2020).

Para analizar el comportamiento individual de ambos grupos de visitantes, se propusieron dos GLMMs para evaluar la influencia del cultivar y del visitante (como factores fijos) en: a) el número de flores visitadas, y b) el tipo de recolectora (sólo néctar o polen). El primer modelo, con estructura de error binomial negativa (debido a la sobredispersión de los datos), incluyó el tipo de visitante (dos niveles) y el parental (dos niveles) como factores fijos, y el logaritmo de la duración de la observación como offset (para considerar el esfuerzo de muestreo). El segundo modelo, con estructura de error binomial Bernoulli, incluyó la interacción entre los factores especie (dos niveles) y parental (dos niveles), y el momento del día (dos niveles) como factores fijos, y la transecta como factor aleatorio.

La constancia floral en líneas MF fue evaluada mediante un GLMM con estructura de error binomial Bernoulli (constantes /no constantes), considerando la especie (2 niveles) como factor fijo, y el logaritmo del número de flores visitadas como offset. La presencia de granos de polen de girasol en el cuerpo de insectos capturados fue analizada con una prueba de homogeneidad de chi cuadrado.

En todos los modelos se inspeccionó la distribución de los residuos, evaluando casos de sobre- o subdispersión, y la significancia de los distintos factores fijos de los modelos fue evaluada partiendo del modelo máximo propuesto mediante la función *anova* para comparar entre modelos anidados (Chambers y Hastie, 1992). Los factores no significativos ( $p > 0,05$ ) fueron removidos (ver Anexo B Tabla B1).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Caracterización de las líneas parentales

Como se esperaba, las dos líneas parentales del híbrido de girasol estudiado difirieron significativamente en los caracteres morfológicos evaluados (Tabla 2.1). Por un lado, las plantas de la línea ME presentaron menor altura que las plantas MF (LR = 29,81  $p < 0,001$ ). Por otro lado, el diámetro de los capítulos de la plantas ME resultó significativamente mayor al de las plantas MF ( $F_1 = 105,23$   $p < 0,001$ ), siendo esta variable un 55% mayor en las inflorescencias ME.

**Tabla 2.1. Dimorfismo parental en un híbrido aceitero de girasol (*Helianthus annuus*).**

Ambos parentales presentaron diferencias en los dos caracteres morfológicos evaluados. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre parentales ( $p < 0,0250$ ).

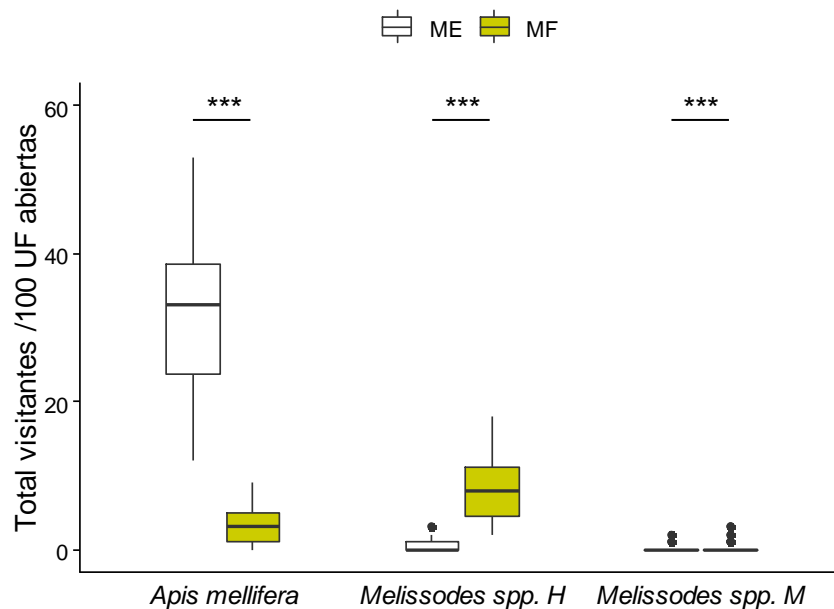
Línea Parental	N	Altura de la planta (cm; media $\pm$ E.E.)	Diámetro del capítulo (cm; media $\pm$ E.E.)
Macho estéril	36	84,6 $\pm$ 1,5 a	11,5 $\pm$ 0,4 A
Macho fértil	35	99,3 $\pm$ 1,9 b	7,4 $\pm$ 0,2 B

### 2.3.2 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp. en ambos parentales

Inicialmente, se relevó la diversidad y abundancia de todos los visitantes florales diurnos de las inflorescencias de girasol en el sitio de estudio (ver Anexo C Tabla C1). Los himenópteros fueron los visitantes más abundantes: *A. mellifera* representó el 66% de un total de 2.515 insectos censados, seguidas por las abejas *Melissodes tintinnans* H. y *Melissodes rufithorax* B. (17%). Estas tres especies de ápidos visitaron tanto inflorescencias ME como MF, pero difirieron en su distribución espacial entre ambos parentales. Mientras las abejas melíferas dominaron en las líneas ME (87% de las visitas censadas), las abejas *Melissodes* spp. fueron los visitantes más abundantes en inflorescencias MF (52%) seguidas por las abejas melíferas (20%). Si bien la mayoría de las abejas *Melissodes* spp. observadas fueron hembras, se registró la presencia de machos visitando el cultivo (412 hembras y 20 machos). Al considerar la distribución de ambos sexos de estas abejas nativas, las hembras representaron el 85% de sus visitas en las plantas ME y el 96% en plantas MF.

El análisis estadístico de la densidad de los tres grupos principales de visitantes del girasol (*A. mellifera*, *Melissodes* spp. hembras y machos) reveló un patrón de recolección diferencial entre ambos

parentales de girasol, dado por la interacción significativa entre el tipo de visitante y la línea parental (Figura 2.3; *parental\*visitante*: LR = 1.207,5  $p < 0,001$ ). En promedio, el número de abejas melíferas por cada 100 UF abiertas en líneas ME resultó 9 veces superior que en líneas MF (en ME:  $31,5 \pm 1,5$  individuos /100 UF abiertas, N = 48 transectas; en MF:  $3,4 \pm 0,4$  individuos /100 UF abiertas, N = 47 transectas; comparaciones *a posteriori* ME vs MF: F.ratio = 15,28  $p < 0,001$ ). Por el contrario, las abejas *Melissodes* spp. hembras fueron 16 veces más frecuentemente encontradas visitando inflorescencias MF que ME (en MF:  $8,3 \pm 0,6$  individuos /100 UF abiertas, N = 47 transectas; en ME:  $0,5 \pm 0,1$  individuos /100 UF abiertas, N = 48 transectas; comparaciones *a posteriori* ME vs MF: F.ratio = 327,03  $p < 0,001$ ), superando por más de dos veces la presencia de *A. mellifera* en inflorescencias MF (comparaciones *a posteriori* para MF, *Melissodes* hembras vs. *Apis*: t.ratio = 9,58  $p < 0,001$ ). En el caso de las abejas *Melissodes* spp. machos aunque resultaron menos abundantes que las hembras, se observó un patrón de visita similar entre parentales, encontrando un número significativamente mayor de individuos visitando inflorescencias MF que ME (en MF:  $0,3 \pm 0,1$  individuos /100 UF abiertas, N = 47 transectas; en ME:  $0,08 \pm 0,05$  individuos /100 UF abiertas, N = 48 transectas; comparaciones *a posteriori* ME vs MF: F.ratio = 28,59  $p < 0,001$ ).



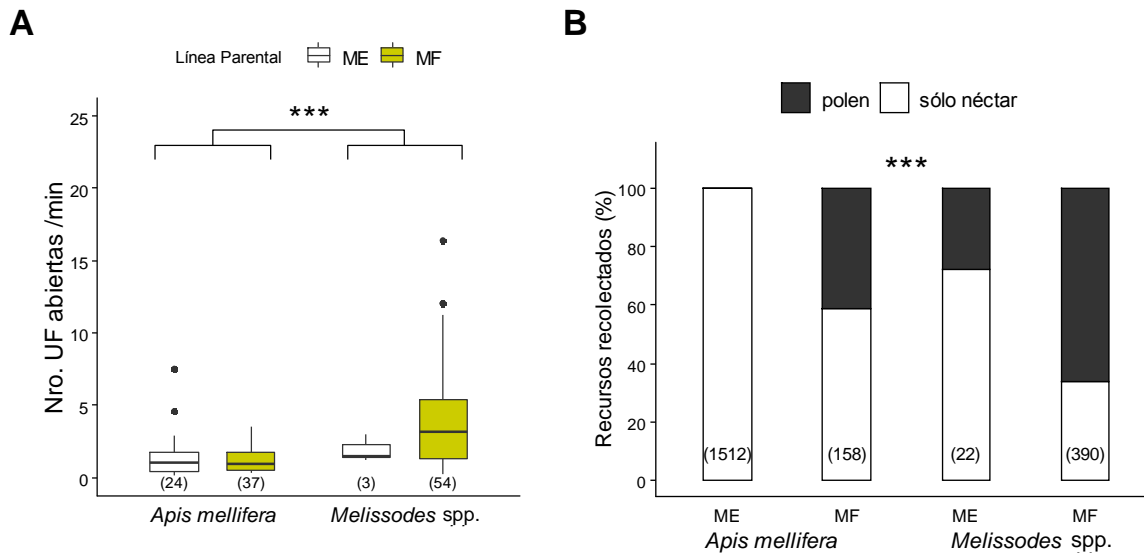
**Figura 2.3. Abundancia de los principales visitantes de inflorescencias de girasol macho estéril (ME) y macho fértil (MF): abejas *Apis mellifera* y abejas *Melissodes* spp. (H, hembras y M, machos).** Número de visitantes encontrados en 100 unidades florales (UF) abiertas a lo largo de 48 transectas en líneas ME y 47 transectas en líneas MF. Las abejas melíferas fueron los visitantes más abundante en inflorescencias ME, mientras que las hembras de *Melissodes* spp. predominaron en inflorescencias MF. (Modelo mínimo adecuado: densidad ~ visitante \* parental + (1|transecta) + offset (log (floración)); \*\*\*,  $p < 0,001$ , ver comparaciones *a posteriori* en el texto principal). Diagramas de caja donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente.

### 2.3.3 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y abejas *Melissodes* spp. a escala individual

#### 2.3.3.1 Número de flores visitadas y recursos recolectados

Ambos grupos de visitantes se diferenciaron en su comportamiento recolector individual (Figura 2.4). Por un lado, las abejas *Melissodes* spp. visitaron un mayor número de UF abiertas por unidad de tiempo que *A. mellifera* (Figura 2.4A, media  $\pm$  E.E., *Melissodes* spp.:  $3,9 \pm 0,5$  [0,2 – 16,4] UF abiertas por minuto, N = 57; *Apis*:  $1,4 \pm 0,2$  [0,1 – 7,5] UF abiertas por minuto, N = 61; *Apis* vs *Melissodes* spp.: LR = 25,07 p < 0,001). Si bien no se encontraron diferencias significativas entre líneas parentales (LR = 0,23 p = 0,6318), dado que la distribución espacial de *Melissodes* spp. mostró un claro sesgo hacia la línea MF, cabe mencionar que sólo se pudieron relevar unos pocos individuos de este grupo visitando inflorescencias ME.

En cuanto al uso de los recursos florales, se encontró que ambos grupos de abejas difirieron en los recursos explotados en el cultivo, existiendo una interacción significativa entre el tipo de visitante y la línea parental (Figura 2.4B; *parental\*visitante*: LR = 22,97 p < 0,001). En inflorescencias ME, mientras las abejas melíferas recolectaban exclusivamente néctar, un 28% de las abejas *Melissodes* spp. cargaban polen en sus patas traseras, es decir, habían visitado previamente inflorescencias MF (comparaciones *a posteriori* para ME, *Melissodes* vs. *Apis*: t.ratio = 6,10 p < 0,001). Sólo se observaron cuatro abejas melíferas con carga de polen corbicular libando néctar en el parental ME. Por el contrario, en inflorescencias MF, la mayoría de los individuos recolectaron polen, aunque esta preferencia fue más pronunciada en *Melissodes* spp. (comparaciones *a posteriori* para MF, *Melissodes* vs. *Apis*: t.ratio = 4,74 p < 0,001). Por otra parte, al considerar el momento del día (mañana o tarde), se encontró que la proporción de individuos recolectores de polen disminuía después del mediodía, aunque en el caso de *Melissodes* spp., se mantuvo una alta proporción de recolectoras de polen durante todo el día (*Apis*: 61% de mañana y 19% de tarde; *Melissodes* spp.: 76% de mañana y 52% de tarde; *momento del día*: LR = 16,71 p < 0,001).



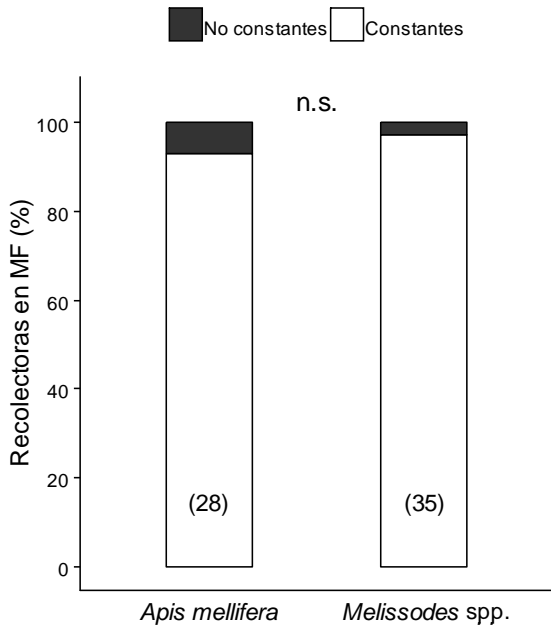
**Figura 2.4. Comportamiento recolector de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp. en las líneas parentales macho estéril (ME) y macho fértil (MF) de girasol. (A) Número de unidades florales (UF) abiertas visitadas por minuto. Las abejas *Melissodes* spp. visitaron un número mayor de UF por minuto que las abejas melíferas, sin importar la línea parental. Diagramas de caja, donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. (B) Recursos recolectados por ambos grupos de visitantes en cada parental. Mientras en líneas ME, *A. mellifera* recolectó casi exclusivamente néctar, las abejas *Melissodes* spp. presentaron cargas de polen en mayor proporción en ambos parentales. Los asteriscos señalan diferencias significativas (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).**

### 2.3.3.2 Constancia floral y potencial transferencia de polen entre parentales

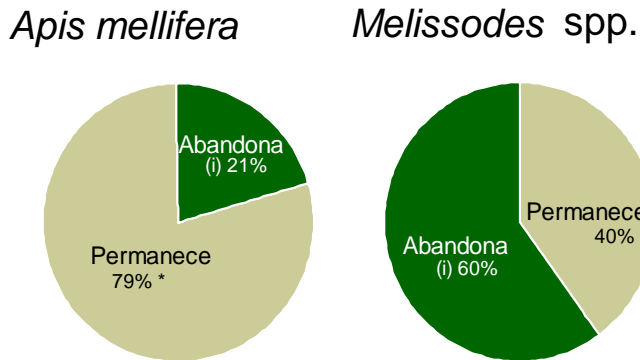
Con el objetivo de evaluar la transferencia de polen desde el parental MF al ME, se determinó la constancia floral de ambos grupos de abejas visitando inflorescencias MF (Figura 2.5). Tanto las abejas melíferas como las *Melissodes* spp. exhibieron una alta constancia floral en la línea MF (LR = 0,43  $p = 0,5128$ ). Esto es, más del 90 % de las abejas no volaron desde una inflorescencia MF a otra ME en sus sucesivas vistas. Por otra parte, todas las *A. mellifera* monitoreadas en inflorescencias ME mostraron fidelidad por dicho parental (N=21).

Además, se evaluó el efecto de las interacciones de las abejas monitoreadas con un segundo visitante floral. Mientras la mayoría de las abejas melíferas permanecieron en la misma inflorescencia, y sólo el 21% de 29 interacciones resultó en el movimiento a otra de la misma línea parental, más de la mitad de las abejas *Melissodes* spp. volaron a otra inflorescencia luego del arribo de un segundo visitante (Figura 2.6; prueba exacta de Fisher de dos colas,  $p = 0,0427$ , N = 29 *A. mellifera*, N = 10 *Melissodes* spp.). En todos los casos, aquellos individuos que abandonaron la inflorescencia, mantuvieron la línea parental, por lo cual no se encontró que las interacciones promovieran los entrecruzamientos entre

parentales. En inflorescencias ME, casi la totalidad de las interacciones de *A. mellifera* fueron intraespecíficas (92%, N = 12); sin embargo, en inflorescencias MF, la mayoría de las interacciones fueron interespecíficas (76%, N = 17). Dada la baja densidad de *Melissodes* spp. en girasoles MF, no se observaron interacciones con un segundo visitante durante 120 minutos de observación.

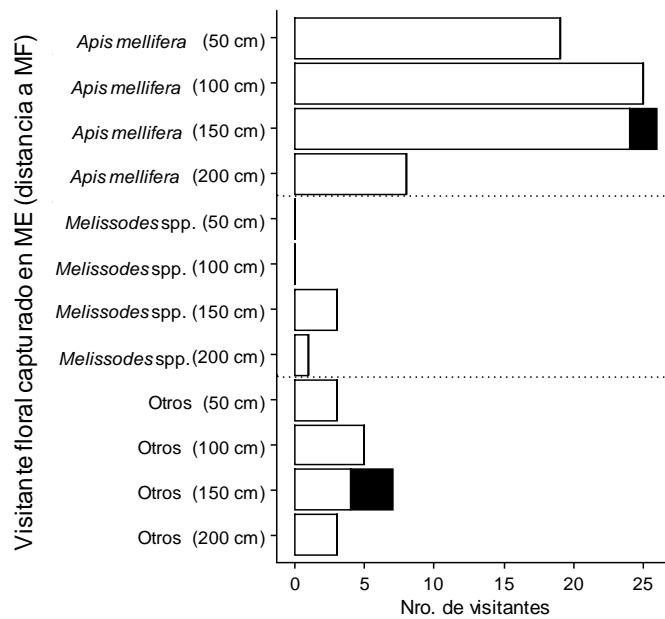


**Figura 2.5. Constancia floral de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp.** en inflorescencias de girasol de la línea parental macho fértil (MF). El porcentaje de individuos recolectando de manera exclusiva en inflorescencias MF se representa en blanco (constantes). El porcentaje de recolectoras que alternaron entre parentales se representa en color negro (no constantes). Ambos grupos de abejas exhibieron alta constancia floral (n.s.,  $p > 0,05$ ). Se indica entre paréntesis el tamaño muestral.



**Figura 2.6. Efecto de la interacción de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp. con un segundo visitante floral en inflorescencias de girasol.** Mientras el 79% de las abejas melíferas permanecieron en la inflorescencia de girasol, un 60% de las abejas *Melissodes* spp. la abandonaron rumbo a otra de igual parental (i) luego del arribo de un segundo visitante (prueba exacta de Fisher:  $p = 0,0427$ ; N = 29 *A. mellifera*, N = 10 *Melissodes* spp.).

Por último, en contraposición a estos resultados, 95 de 100 insectos capturados visitando inflorescencias ME portaban granos de polen de girasol en su cuerpo (Figura 2.7;  $\chi_1^2 = 81$ ,  $p < 0.001$ ,  $N = 100$ ). El mismo patrón de resultados se observó para todos los taxones evaluados (correspondiendo el 78% a *A. mellifera*), así como para las cuatro distancias evaluadas respecto de la línea dadora de polen más cercana. A pesar de que la gran mayoría de las abejas melíferas visitando inflorescencias ME no presentaban cargas de polen en sus patas traseras como hemos mencionado en la sección anterior, el 97% de los individuos capturados portaban granos de polen de girasol en su cuerpo.



**Figura 2.7. Presencia de granos de polen de girasol en el cuerpo de los principales grupos de visitantes florales capturados en inflorescencias macho estéril (ME).** Identidad y número de insectos capturados en hileras de plantas ME ubicadas a distancia variable de las hileras de plantas dadoras de polen (macho fértil, MF). Se indica en blanco el número de visitantes con polen de girasol en su cuerpo, y en negro el número de individuos sin polen de girasol. La mayoría de los visitantes presentaron polen de girasol en sus cuerpos, para todas las distancias evaluadas ( $\chi_1^2 = 81$ ,  $p < 0.001$ ;  $N = 100$ ; Otros, incluye individuos de los taxones Coleoptera, Orthoptera y Hemiptera).

## 2.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que en cultivos de girasol para la producción de semillas híbridas con un marcado dimorfismo parental, las abejas *Apis mellifera* y las abejas nativas del género *Melissodes* presentaron una distribución espacial diferencial entre las líneas macho fértil



(MF) y las líneas macho estéril (ME), de acuerdo a los recursos que ofrece cada parental a los polinizadores. Mientras que las abejas melíferas fueron dominantes en las inflorescencias ME, las abejas oligolécticas *Melissodes* spp. hembras representaron la amplia mayoría en inflorescencias MF. Esta distribución se vio reflejada en el recurso explotado por cada grupo de visitantes a escala individual. La gran mayoría de las abejas melíferas recolectaron exclusivamente néctar y sólo una pequeña proporción de individuos recolectaron activamente polen o portaban cargas corbiculares en inflorescencias MF. Contrariamente, una alta proporción de abejas *Melissodes* spp. recolectaron polen durante todo el día y visitaron un mayor número de inflorescencias por unidad de tiempo que *A. mellifera*. En relación con la transferencia de polen desde plantas MF a plantas ME, ambos grupos exhibieron una alta constancia floral mientras visitaban inflorescencias MF, y la constancia de *A. mellifera* no fue alterada por la interacción con un segundo visitante floral. Por último, a pesar de que la mayoría de las abejas melíferas fueron encontradas en líneas ME recolectando néctar (sin presentar carga corbicular), se observó polen de girasol en el cuerpo de la mayoría de individuos capturados, por lo cual los granos de polen serían transferidos a las inflorescencias productoras de semilla por las abejas sociales.

#### *Patrón de recolección en ambos parentales*

En el sistema relevado, los visitantes florales más abundantes fueron las abejas *A. mellifera* y las abejas solitarias nativas *M. tintinnans* y *M. rufithorax*. Estos resultados concuerdan con la diversidad y abundancia reportada en campos agrícolas de girasol de la región pampeana (Torretta *et al.*, 2010; Chamer *et al.*, 2020). Por otra parte, las dos especies del género *Melissodes* emergen sincrónicamente con el comienzo de la floración del girasol en esta región y son consideradas como oligolécticas, con una fuerte preferencia por el polen de Asteraceae, siendo el polen de girasol uno de los componente principales de sus dietas (Cilla *et al.*, 2012).

Ambos grupos de abejas presentaron una distribución espacial diferencial dentro del cultivo de girasol, exhibiendo el híbrido estudiado un marcado dimorfismo entre parentales (Tabla 2.1). Las abejas melíferas fueron mayoritariamente encontradas recolectando néctar en inflorescencias ME. Su densidad en esta línea parental superó por más de 9 veces la de las abejas visitando inflorescencias MF (Figura 2.3). Estas diferencias entre parentales coinciden con las observadas por Parker (1981), aunque otros estudios documentaron densidades similares de abejas melíferas para ambos parentales (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993; DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000). En el presente estudio la baja densidad de abejas en líneas MF podría deberse al diseño de la plantación (con una baja relación de hileras MF:ME) y a la baja preferencia de las abejas melíferas por el polen de girasol a pesar de ser un recurso abundante (Percival, 1955; Louveaux, 1959). El polen de girasol es considerado un polen de

baja calidad nutricional para las abejas debido a su bajo contenido de proteína cruda (Somerville, 2001), lo cual podría explicar la preferencia de colmenas presentes en cultivos de girasol por otros pólenes de flora alternativa presente en los alrededores (Andrada *et al.*, 2004; Charrière *et al.*, 2010). Cabe mencionar que se ha visto un potencial efecto medicinal del polen de girasol en condiciones controladas de laboratorio, reduciendo la infección por nosemosis en *A. mellifera* aunque con el costo de cierta mortalidad (Giacomini *et al.*, 2018). También se ha encontrado una mayor preferencia de las abejas nodrizas por la miel de girasol al aumentar sus niveles de infección, sugiriendo un comportamiento de auto-medicación que podría modificar el comportamiento recolector en función del estado sanitario de la colonia (Gherman *et al.*, 2014).

Por otro lado, las abejas *Melissodes* spp. visitaron principalmente inflorescencias MF (Figura 2.4), superando la densidad de abejas melíferas en dicho parental aún cuando la población total de *A. mellifera* era considerablemente mayor en el sistema. Las abejas nativas recolectaron tanto néctar como polen en esta línea parental. Tal diferencia en los recursos explotados por cada grupo de abejas está relacionada con su dieta y su forma de vida. Las abejas sociales recolectan y almacenan recursos de acuerdo a los requerimientos de la colonia y suelen especializarse en la recolección de un tipo de recompensa (en este caso, néctar o polen) en cada vuelo de recolección (von Frisch, 1967). En cambio, las abejas solitarias suelen recolectar néctar y polen en un mismo vuelo, lo cual logran más eficientemente visitando inflorescencias MF ya que este parental ofrece ambos recursos (DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000). Estos resultados concuerdan con los reportados por Tepedino y Parker (1982) para otra especie oligoléctica del mismo género, *M. agilis*, la cual también mostró preferencia por los girasoles MF. Estudios previos en plantaciones comerciales de Norteamérica (área de distribución nativa del girasol) documentaron una amplia diversidad de abejas nativas silvestres visitando el cultivo, entre las cuales las abejas *Melissodes* spp. se encontraban entre los visitantes más frecuentes y presentaron una alta eficiencia de polinización por visita, en contraposición a las abejas melíferas que fueron menos comunes en dichos entornos (Mallinger *et al.*, 2018). Sin embargo, dicha eficiencia podría verse reducida en cultivares con alto dimorfismo entre las líneas ME y MF. Por otra parte, la mayor parte de la producción global de girasol ocurre en regiones por fuera su área de distribución nativa (FAOSTAT, 2021), donde la diversidad local de polinizadores puede verse restringida a unas pocas especies y el servicio de polinización es brindado principalmente por colmenas trashumantes de *A. mellifera*. Teniendo esto en cuenta, resulta relevante identificar los grupos de polinizadores presentes en cada sistema agrícola y evaluar su comportamiento y así tener una mejor comprensión de la contribución de cada grupo funcional a la polinización del cultivo de interés (Hoehn *et al.*, 2008; Winfree *et al.*, 2015).

### *Constancia floral y potencial transferencia de polen entre parentales*

Tanto *A. mellifera* como *Melissodes* spp. exhibieron una alta constancia floral al visitar inflorescencias MF (Figura 2.5), lo cual disminuye la potencial transferencia de polen hacia inflorescencias ME, en detrimento del rendimiento del cultivo. En concordancia con Susic Martin y Farina (2016), una menor frecuencia de entrecruzamientos entre parentales podría deberse a un marcado dimorfismo entre ambos. La fidelidad de las abejas melíferas a un mismo tipo de inflorescencia no se vio alterada por las interacciones interespecíficas con un segundo visitante floral (Figura 2.6), contrariamente a lo observado por Carvalheiro y colaboradores (2011). Más aún, las pocas abejas que abandonaron la inflorescencia luego del arribo de otro visitante volaron hacia otra del mismo tipo, sin realizar entrecruzamientos entre líneas parentales, a diferencia de los resultados obtenidos por Greenleaf y Kremen (2006) quienes relevaron una mayor probabilidad de que las abejas melíferas vuelen de líneas MF a ME luego de la interacción con abejas nativas. Las discrepancias mencionadas pueden deberse a una diferencia en el tamaño muestral y las especies evaluadas, dado que los autores no discriminaron la identidad de las abejas nativas interactuantes (englobando 33 especies distintas). Además, el grado de sociabilidad podría influenciar el tipo de interacción, en función al tipo de recurso recolectado por cada especie de abeja nativa según los requerimientos de las abejas solitarias o bien de la colonia en el caso de abejas sociales. En la presente Tesis las interacciones se circunscriben a dos grupos con organización social muy disímil, siendo las abejas melíferas eusociales, y *Melissodes* spp. abejas solitarias que anidan en agregación.

De todas maneras, todas las abejas melíferas capturadas en inflorescencias ME portaban granos de polen de girasol adheridos en sus cuerpos (Figura 2.7). Dada la pronunciada fidelidad de las abejas a este parental en el cultivar estudiado, la transferencia del polen no ocurriría de manera directa en las sucesivas visitas de una abeja durante un mismo ciclo de recolección, sino que podría darse luego del contacto entre abejas recolectoras en la colonia (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993; Susic y Martin, 2016) o bien al distribuir el polen previamente depositado por abejas nativas en la inflorescencia (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1995). Esto último parece poco probable dado que la densidad de abejas *Melissodes* en líneas ME fue muy baja. La transferencia de polen mediante el contacto entre compañeras de nido sería más probable ya que se ha visto en un estudio previo en un híbrido de girasol altamente dimórfico que las abejas capturadas en distintas áreas de las colmenas (tanto en la entrada como dentro del nido) presentaban granos de polen de girasol adheridos en sus cuerpos (Susic Martin y Farina, 2016). Así, los contactos entre miembros de la colonia (exclusivos de abejas sociales) podrían parcialmente compensar la baja frecuencia de entrecruzamientos entre líneas parentales.

### *Implicancias para la polinización de cultivos dimórficos*

En suma, los resultados obtenidos en este capítulo muestran una marcada preferencia de las abejas nativas solitarias *M. tintinnans* y *M. rufithorax* por las líneas MF, recolectando mayoritariamente polen y exhibiendo una alta constancia floral en este parental. Parker (1981) sugiere que la presencia de abejas especialistas, altamente eficientes en la recolección de polen de girasol, podría impactar negativamente la polinización del cultivo. Más aún, el éxito reproductivo del girasol podría verse reducido tanto por la remoción de polen por abejas oligolécticas como por la preferencia de las abejas melíferas por inflorescencias ME para obtener néctar. Además de la recolección diferencial de recursos por parte de los polinizadores, otros factores que pueden afectar el rendimiento del girasol para la producción de semillas híbridas son el esquema de plantación de los parentales, el tamaño de las poblaciones de polinizadores no-*Apis* (DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000) y la frecuencia de visita particularmente de aquellas abejas nativas especialistas en girasol.

Como se ha mencionado en la introducción general, el comportamiento recolector de las abejas puede verse influenciado por diversas características del cultivo, como la morfología floral y las recompensas ofrecidas. Al comparar tales rasgos entre distintos cultivares de girasol (en términos del largo de la corola y la cantidad y calidad del néctar), se encontró que tanto las abejas melíferas como las abejas nativas visitaban con mayor frecuencia aquellas variedades que presentaban corolas más cortas y que ofrecían néctar con mayor cantidad de azúcares (Mallinger y Prasifka, 2017; Prasifka *et al.*, 2018). Los estudios mencionados señalan la viabilidad y relevancia de seleccionar caracteres florales relacionados con el néctar para mejorar la relación cultivo-polinizador como parte de los programas de desarrollo genético. A pesar de la gran diversidad de cultivares actualmente disponibles y del continuo desarrollo de nuevos genotipos con el objetivo de mejorar los rendimientos del cultivo de girasol, la selección de un cultivar rara vez considera el comportamiento de polinizadores como un factor relevante para la producción, siendo más comúnmente evaluados factores tales como la resistencia a plagas y enfermedades, y los requerimientos de nutrientes y riego (Vear, 2016).

La comprensión de los distintos factores implicados en las interacciones cultivo-polinizador, tales como la diversidad de los visitantes florales, las estrategias de recolección de recursos de las especies más abundantes, su constancia floral y el efecto de las interacciones interespecíficas, permitiría una mejor evaluación de la contribución de cada grupo de polinizadores al rinde del cultivo. En particular, en el sistema estudiado, la presencia de *M. tintinnans* y *M. rufithorax* no contribuiría a la polinización del cultivo de forma directa (debido a su baja preferencia por líneas ME) ni de forma indirecta (mediante

interacciones con *A. mellifera*). Aún cuando las abejas melíferas mostraron una marcada preferencia por las líneas ME y una alta constancia floral, su comportamiento social facilitaría la transferencia de granos de polen girasol entre individuos en el nido, que luego podrían ser depositados en los estigmas de las inflorescencias ME. A pesar de que la evidencia presentada es específica para híbridos de girasol, se esperaría un escenario similar en otros cultivos dimórficos que presentan una línea dadora de polen y otra productora de frutos.

## Comportamiento recolector de *Apis mellifera* y del abejorro nativo *Bombus pauloensis* en cultivos de arándano

### 3.1 Introducción

Si bien *Apis mellifera* es el principal polinizador utilizado en ecosistemas agrícolas (McGregor, 1976; Delaplane y Mayer, 2000; Klein *et al.*, 2007), la creciente demanda de servicios de polinización ha impulsado el manejo de especies alternativas, como abejas de los géneros *Osmia*, *Bombus*, *Megachile* y *Xylocopa* (Mader *et al.*, 2010; Roubik, 2018a). En particular, los abejorros *Bombus* spp. son polinizadores eficientes de cultivos de invernadero, como el tomate y el pimiento, y también en cultivos abiertos o semi-cubiertos como el arándano y el kiwi (Stubbs y Drummond, 2001; Pomeroy y Fisher, 2002; Aldana *et al.*, 2007; Riano *et al.*, 2015). Más aún, un manejo integrado en el cual se combinan especies nativas manejadas o silvestres con colonias de abejas melíferas puede mejorar el servicio de polinización debido a que presentan patrones complementarios en su comportamiento recolector (Martins *et al.*, 2015; Koh *et al.*, 2018).

El arándano de tipo 'Southern Highbush' (*Vaccinium corymbosum*) es un cultivo nativo del este de Norteamérica, cuya producción mundial ha crecido sosteniblemente en los últimos años (reportando un incremento del 55% en el período 2014-2019, y un total de 823 mil toneladas en 2019: FAOSTAT, 2021). En particular, la superficie cosechada en Sudamérica se ha disparado en la última década, y la producción en Argentina fue de 20 mil toneladas en 2019, representando el 3% de la producción mundial de dicho año (ABC, 2019; FAOSTAT, 2021). Dado que la producción de frutos se beneficia de la polinización cruzada, se suelen plantar dos o más variedades con similar fenología en hileras adyacentes (MacKenzie, 1997; Delaplane y Mayer 2000; Klein *et al.* 2007; Isaacs y Kirk 2010). Existen numerosos cultivares con variadas morfologías florales, lo cual puede afectar el comportamiento recolector de las distintas especies de polinizadores (Ritzinger y Lyrene, 1999; Courcelles *et al.*, 2013). Al estudiar las flores de cuatro cultivares de arándano de tipo 'Northern Highbush', Courcelles y colaboradores (2013) reportaron diámetros de corola menores a 2 mm y largos de corola superiores a

8,5 mm, esto es, mayores al largo funcional de la probóscide de *A. mellifera* (Waddington y Herbst, 1987), observándose un mayor número de visitas en el cultivar con mayor diámetro de apertura de la corola. Sumado a la morfología floral restrictiva, la variabilidad entre cultivares en la cantidad y calidad de néctar podría también influenciar la atracción de los polinizadores (Pacini y Nepi, 2007). Por otro lado, las flores de arándano poseen anteras de dehiscencia poricida que requieren ser vibradas para liberar una gran cantidad de polen. Como las abejas melíferas no realizan este tipo de comportamiento, son consideradas polinizadores menos efectivos de este tipo de flores que los abejorros del género *Bombus* y las abejas del género *Andrena* (Javorek *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2013; Moquet *et al.*, 2017). Asimismo, la dificultad de acceso a las recompensas en este tipo de flor puede llevar a las abejas a buscar recursos alternativos en áreas lindantes al cultivo, lo cual se ha evidenciado en una baja proporción de recolección de polen de arándano respecto de otras especies del entorno (Colwell *et al.*, 2017). Por otro lado, en el hemisferio sur muchos cultivares de floración temprana comienzan a florecer en el invierno, momento en que hay poca disponibilidad de recursos florales para las abejas y las colmenas se encuentran con una población reducida. Más aún, las condiciones climáticas adversas (heladas, granizo, viento) pueden disminuir la actividad de las recolectoras (Corbet *et al.*, 1993). En consecuencia, los productores de arándano suelen contratar un alto número de colmenas (en promedio, 6-12 colonias por hectárea; Isaacs y Kirk, 2010; Gibbs *et al.*, 2016).

A diferencia de *Apis mellifera*, los abejorros *Bombus* spp. presentan varias características que le brindan una gran capacidad polinizadora en cultivos de arándano (Goulson, 2010). Son capaces de vibrar las anteras poricidas y debido a su mayor tamaño pueden cargar una mayor cantidad de granos de polen adheridos en su cuerpo y así transferirlos a los estigmas de las flores visitadas (Willmer *et al.*, 1994; King y Buchmann, 2003). Además, recolectan recursos en condiciones adversas, a temperaturas más bajas que *Apis mellifera* y en días de baja luminosidad (Corbet *et al.*, 1993). De hecho, especies de *Bombus* silvestres y manejadas son consideradas polinizadores más eficientes del arándano frente a las abejas melíferas (Javorek *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2013; Stubbs y Drummond, 2001; Benjamin y Winfree, 2014). A pesar de la eficiencia polinizadora de algunas especies de *Bombus* criadas artificialmente, el comercio internacional de colonias de abejorros ha suscitado preocupación respecto del potencial impacto de especies invasoras en las poblaciones de polinizadores nativos (Dafni *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2013). En consecuencia, existe un gran interés en el manejo de especies nativas de *Bombus* para brindar servicios de polinización.

En Argentina, el abejorro nativo *Bombus pauloensis* es utilizado para la polinización del arándano. Esta especie de abejorro es la más abundante y la más ampliamente distribuida en Argentina, y su

distribución coincide con las principales regiones productivas de arándano en nuestro país (Abrahamovich *et al.*, 2001). Las colonias comerciales de abejorros se introducen en el cultivo junto con colmenas de abejas melíferas, las cuales siguen siendo el principal polinizador manejado. Además de las características ya mencionadas, *B. pauloensis* posee una probóscide más larga que *A. mellifera* (Waddington y Herbst, 1987; Arbulo *et al.*, 2011), por lo cual puede libar el néctar de flores urceoladas con mayor facilidad. Por otra parte, como se ha mencionado en la introducción general, los individuos recolectores de polen de *B. pauloensis* presentan niveles más altos de constancia floral (mayores al 80%) que los de otras especies de abejorros (Rossi *et al.*, 2015). Sin embargo, el análisis palinológico de las cargas de néctar de *B. pauloensis* reveló que sólo el 59% eran puras, es decir, correspondían a vuelos constantes entre flores de la misma especie dentro de un parche floral diverso. Aunque son escasos los estudios de constancia floral en plantaciones de distintos cultivares de la misma especie, resulta de interés evaluar este comportamiento en plantaciones mixtas, ya que una menor fidelidad a un dado morfotipo le otorgaría a este polinizador una ventaja frente a las abejas melíferas.

Estudios previos en cultivos de arándano en Argentina, documentan el efecto positivo de la suplementación de colmenas con abejorros en parámetros de calidad del fruto, como el peso, el calibre y el contenido de sólidos solubles totales (Díaz, S.A. *et al.*, 2013) y en el rendimiento del cultivo (Carlazara *et al.*, 2013). Por otro lado, el número de semillas por fruto, utilizado como indicador del éxito reproductivo, fue máximo en condiciones de polinización libre, en comparación con los tratamientos con jaulas de vuelo para *A. mellifera* y para *B. pauloensis* (Cavigliasso *et al.*, 2020). En dicho entorno, los visitantes relevados bajo el tratamiento de polinización libre incluyeron mayoritariamente a las abejas melíferas, seguidas por véspidos y sírfidos, sin observarse la presencia de abejorros silvestres. Por otra parte, los estudios mencionados no evaluaron el comportamiento recolector de las abejas y abejorros y sus posibles interacciones en una plantación mixta de arándano, en el cual los cultivares podrían diferir en la atracción de polinizadores.

En este estudio, se propone comparar el comportamiento recolector de colonias comerciales de *A. mellifera* y *B. pauloensis* en dos cultivares de arándano de floración solapada que suelen sembrarse juntos (Emerald y San Joaquín). En una primera etapa se plantea caracterizar ambos cultivares en términos de morfología floral y oferta de néctar. Además, se plantea evaluar el patrón de recolección de ambos polinizadores por un lado a escala poblacional, en términos de densidad de individuos visitando cada cultivar en dos años con distintas densidades de colonias por hectárea, y por otro lado, a escala individual. Para ello, se propone realizar seguimientos de individuos durante sus vuelos de recolección, registrando el número de flores visitadas, el tipo de recurso recolectado y la constancia



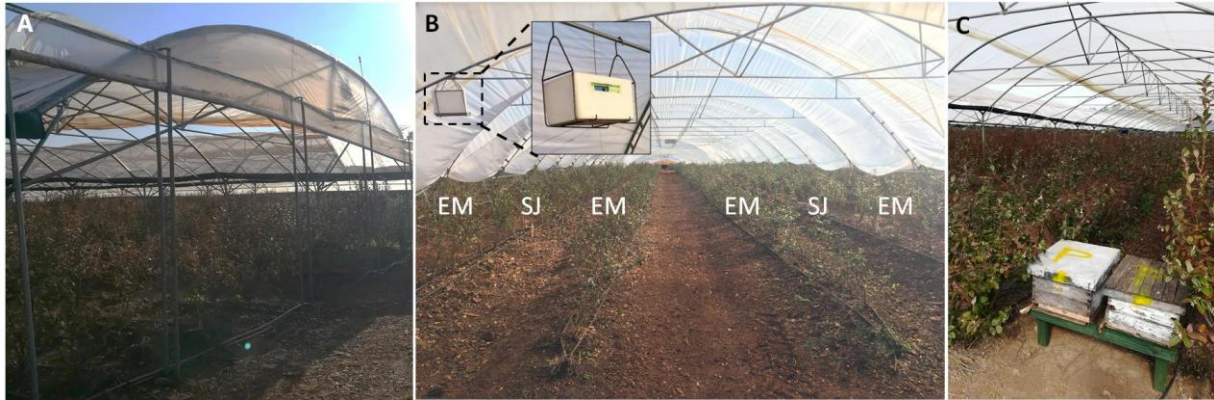
floral en cada cultivar. Por último, se propone cuantificar la carga de polen de arándano en el cuerpo de recolectoras de cada especie para estimar la potencial transferencia de polen entre flores visitadas.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Sitio de estudio y animales

Se realizaron ensayos de campo durante julio de 2017 y 2019 en una plantación de arándano de tipo 'Southern Highbush' (*Vaccinium corymbosum*) en el establecimiento La Fe (27°56'45"S, 56°5'30"O), ubicado en la cercanía de la localidad de Gobernador Virasoro, en la provincia de Corrientes, Argentina. Se seleccionaron los cultivares Emerald (EM, *V. corymbosum* x *V. darrowi*), de autocompatibilidad media (Patente N° USPP12165) y San Joaquín (SJ, híbrido de *V. corymbosum*), de muy baja autocompatibilidad (Patente N° USPP19342), los cuales estaban sembrados bajo macrotúneles abiertos e interconectados entre sí. Cada macrotúnel medía 10 x 50 x 3,5 m (ancho x largo x alto) y consistía en una estructura de parantes de metal y una cubierta plástica superior para proteger el cultivo del granizo pero sin paredes laterales para facilitar la ventilación. Bajo cada macrotúnel se disponían en dos grupos de 3 hileras alternadas de ambos cultivares (1 EM : 1 SJ : 1 EM; distancia entre hileras = 1,7 m) separados por una calle interna (2,7 m ancho) (Figura 3.1A). Se seleccionaron un total de 306 hileras de cultivo que incluían un total de 25.212 plantas de arándano de la misma edad, las cuales ocupaban una superficie de 2,65 ha en dos zonas del campo (de 1 ha y 1,65 ha, respectivamente). Ambas zonas distaban aproximadamente 400 m entre sí, separadas por cortinas de árboles, y estaban sujetas a las mismas prácticas de manejo en términos de riego y aplicación de agroquímicos y fertilizantes (ver Anexo A Figura A2).

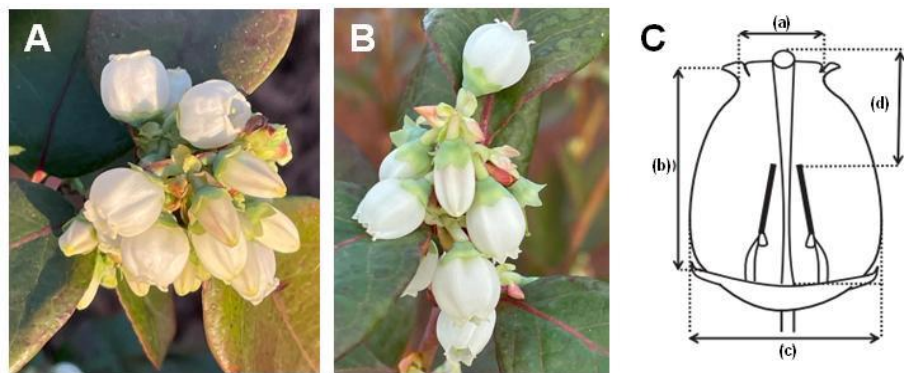
Para brindar servicio de polinización, se habían introducido colonias comerciales de abejas *Apis mellifera* (con una población de alrededor de 15.000 obreras) y de abejorros *Bombus pauloensis* (100-120 obreras), alcanzando diferente densidad de colonias por hectárea en cada año. En 2017, se utilizaron en el estudio 33 colmenas de abejas melíferas dispuestas por fuera de los macrotúneles a 10 m del cultivo (con una densidad de 5,6 colmenas /ha). Por otra parte, se utilizaron 24 nidos de abejorros, los cuales estaban ubicados entre las hileras del cultivo, bajo los macrotúneles (con una densidad de 4 nidos /ha) (Figura 3.1B). En 2019, se utilizaron 115 colmenas localizadas en uno de los bordes del cultivo, entre las hileras (con una densidad de 20 colmenas/ha) (Figura 3.1C), y 36 nidos de abejorros ubicados en el borde opuesto (con una densidad de 6 nidos/ha).



**Figura 3.1. Cultivo de arándano *Vaccinium corymbosum* bajo macrotúneles.** (A) Vista exterior de los macrotúneles, provistos de una cubierta de plástico e interconectados lateralmente. (B) Vista interior de un macrotúnel cubriendo seis hileras de dos cultivares intercalados (EM: Emerald, SJ: San Joaquín). Se muestra en detalle un nido de *Bombus pauloensis* ubicado en uno de los extremos del macrotúnel. (C) Vista interior mostrando la ubicación de dos colmenas de *Apis mellifera* en el extremo opuesto del macrotúnel. Crédito fotográfico: INSSOC.

### 3.2.2 Caracterización de los cultivares de arándano

Los cultivares Emerald y San Joaquín son variedades de floración temprana, que usualmente alcanzan el pico de floración hacia fines de julio en la región del noreste argentino. En primera instancia, se caracterizó la morfología floral y oferta de néctar de ambos cultivares. Para evaluar diferencias morfológicas en la temporada de 2019, se tomaron medidas morfométricas de una flor recientemente abierta por inflorescencia por planta (N = 55 flores EM y N = 54 flores SJ). Las flores recién cortadas se preservaron de forma individual en etanol 95% hasta el momento de realizar las mediciones en el laboratorio. Siguiendo la metodología descrita por Courcelles y colaboradores (2013) se registraron las siguientes variables con un calibre digital: diámetro de apertura de la corola, largo de la corola desde la base hasta el borde de la apertura y ancho de la corola medido en su punto más ancho (Figura 3.2). Además, se midió la distancia entre las anteras y el estigma luego de realizar una pequeña incisión en la corola con un bisturí de manera de exponer ambas estructuras *in situ*.



**Figura 3.2. Morfología floral del arándano *Vaccinium corymbosum*.** Flores de arándano, pendulares, con corolas tubulares y dispuestas en racimos, cultivares Emerald (A) y San Joaquín (B). (C) Esquema de una flor mostrando las variables morfométricas evaluadas: (a) diámetro de apertura de corola, (b) largo y (c) ancho de corola, y (d) distancia entre anteras y estigma (adaptado de Courcelles *et al.*, 2013).

Por otra parte, se caracterizó la oferta de néctar de ambos cultivares en términos de la disponibilidad instantánea ('nectar standing crop') y de la producción de néctar de flores no visitadas. En 2017, se evaluó la disponibilidad instantánea de néctar en flores recién cortadas de ambos cultivares (1 flor/planta; N = 59 EM y N = 47 SJ) extrayendo el mismo mediante microcapilares de vidrio graduados de 5  $\mu$ l, con especial cuidado de no dañar el nectario. Se midió en cada flor: el volumen de néctar (a partir de la altura de líquido en el tubo capilar) y la concentración estimada de azúcares expresada en % peso en peso (%p/p, equivalente a g de sacarosa por 100 g de solución) con un refractómetro de mano (Carl Zeiss, precisión: 0–85  $\pm$  0.5%). Debido a que los compuestos diluidos en el néctar pueden variar el ángulo de refracción, y en consecuencia modificar el resultado obtenido con el refractómetro, es que se habla de concentración estimada. En 2019 se midió la producción de néctar durante los primeros tres días desde la antesis de la flor (la corola cae al cuarto día). Para ello, se cubrieron ramas floríferas con bolsas de tela de voile previo a su antesis de manera de impedir la visita de polinizadores y permitir la acumulación de néctar (1 rama por planta; N = 11 plantas EM y N = 10 plantas SJ). Durante cuatro días sucesivos se marcaron todas las flores recién abiertas para poder establecer su edad. Las extracciones de néctar se realizaron durante dos días a la misma hora en flores de distintas edades (1 a 3 días), midiendo una única vez cada flor.

Cabe mencionar que, si bien la floración de ambos cultivares se solapó en ambas temporadas, las plantas Emerald poseían un mayor número de flores que las plantas San Joaquín (media  $\pm$  E.E. en 2017: EM: 45,7  $\pm$  5,6 flores abiertas por planta, y SJ: 18,0  $\pm$  3,0 flores abiertas por planta, N = 32

plantas/cultivar; en 2019: EM:  $59,8 \pm 5,8$  flores abiertas por rama, y SJ:  $40,1 \pm 3,2$  flores abiertas por rama, N = 32 plantas/cultivar).

### **3.2.3 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* a escala poblacional**

Se relevó la densidad de abejas melíferas y abejorros en el cultivo, registrando diariamente el número de individuos recolectando en flores de ambos cultivares durante cuatro y cinco días consecutivos en 2017 y 2019, respectivamente, de 9:30 a 16:30 hs, correspondiente al momento de mayor actividad de los polinizadores. Se registró el número de individuos de cada especie a lo largo de transectas lineales de 50 m en ambas zonas del campo en ambos años (N = 126 transectas en 2017 y N = 243 transectas en 2019). Las observaciones se realizaron tanto de mañana como de tarde, en caso de que hubiera un sesgo en el horario de actividad de los polinizadores. Además, se consideró la distribución de los nidos de abejorros, distinguiendo entre aquellas transectas cercanas (a menos de 5 hileras) y aquellas alejadas (a más de 5 hileras) de un nido.

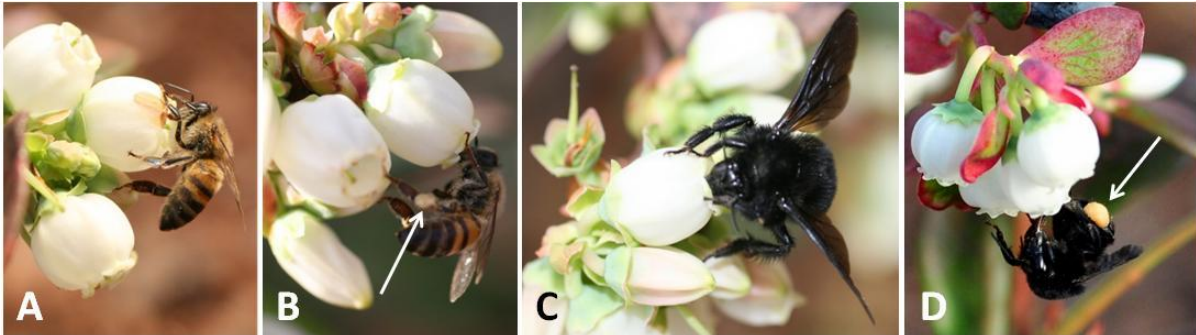
### **3.2.4 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* a escala individual**

#### **3.2.4.1 Número de flores visitadas y recursos recolectados**

Se relevó el comportamiento individual de ambas especies monitoreando individuos durante sus sucesivas visitas florales desde el momento en que se posaban en una flor de arándano hasta que eran perdidas de vista. Se realizaron 89 seguimientos de cada especie durante cuatro días consecutivos en 2017, registrando el número de flores visitadas, la duración de las visitas, el cultivar y el momento del día (AM: 9 a.m. a 1 p.m.; PM: 1 a 4 p.m.).

Para evaluar diferencias en el uso de los recursos florales por cada especie, se relevó el tipo de recurso (néctar o polen) recolectado en cada visita, distinguiendo el cultivar y el momento del día durante los dos años (N = 149 individuos por especie por año). Aquellos individuos portando carga de polen en sus corbículas fueron considerados como recolectoras de polen, mientras que aquellos que introducían la probóscide en la corola, sin carga de polen corbicular, fueron considerados como recolectoras de néctar (Figura 3.3). Por otra parte, se tuvo en cuenta si se trataba de una visita

legítima (si la recolectora introducía su probóscide a través de la apertura apical de la corola) o de robo secundario de néctar (si la recolectora introducía la probóscide a través de algún orificio previamente realizado por otro insecto en la base de la corola, sin entrar en contacto con las estructuras reproductivas de la flor) (Inouye, 1980).



**Figura 3.3. Seguimiento de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* visitando flores de arándano.** Aquellos individuos con la probóscide introducida en la corola, sin carga de polen corbicular, fueron considerados como recolectoras de néctar (**A**, *A. mellifera*; y **C**, *B. pauloensis*), mientras que aquellos con carga de polen en sus patas traseras fueron categorizados como recolectoras de polen (**B** y **D**, la flecha señala la carga de polen). Crédito fotográfico: INSSOC.

#### 3.2.4.2 Carga de polen de arándano en el cuerpo de las recolectoras

Para estimar la carga de polen en el cuerpo de cada especie, se capturaron recolectoras en 2019 (N = 50 abejas melíferas y N= 37 abejorros). Luego de su captura cada individuo fue colocado en un vial e inmediatamente dormido en frío y luego preservado en freezer hasta el momento de procesar la muestra en el laboratorio.

Siguiendo la metodología descrita por Hoffman y colaboradores (2018), se realizó la disección de cada individuo capturado, dividiendo el cuerpo en tres regiones: cabeza, patas y tórax-abdomen (luego de remover las alas). Dado que distintas estructuras florales son contactadas por distintas partes del cuerpo de los visitantes según el tipo de recurso recolectado, se distinguió entre recolectoras de néctar y de polen. Se categorizó como recolectora de polen a aquellos individuos con carga corbicular, y se descartaron sus patas traseras para la cuantificación. Aquellos individuos sin carga de polen corbicular fueron categorizados como recolectoras de néctar. Luego de la disección cada región fue colocada en un tubo de microcentrífuga conteniendo 0,5 ml de hexano (o 0,5 ml de etanol 96% en el caso del tórax-abdomen). Cada muestra fue agitada mediante vórtex por 30 segundos, luego a un baño de ultrasonido durante 30 minutos (Lavador Ultrasónico Testlab modelo TB02, 40 Khz), y luego a una

segunda agitación de 30 segundos. Después de remover las partes del cuerpo, la solución de polen fue centrifugada durante 1 minuto a 5.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, reemplazándolo por etanol 96%. Previo al momento de cuantificación, cada muestra fue centrifugada durante 30 segundos a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, quedando una solución de polen de 0,03-0,04 ml en cada tubo. Luego de agitar suavemente con una micropipeta, dos alícuotas de 10  $\mu$ l de solución fueron colocadas en las dos cámaras de conteo de un hemocitómetro con fondo metálico (Marienfeld Neubauer-mejorado) para cuantificar el polen de arándano. Se registró el número total de tétradas contenidas en la grilla de conteo completa, dado que el tamaño de los granos de polen de arándano es considerablemente mayor al de las células sanguíneas (35–71  $\mu$ m vs 6–8  $\mu$ m). Se calculó la carga total de polen por muestra a partir del volumen de ambas cámaras de conteo (informado por el fabricante) y el volumen total de la solución de polen de la muestra. Dado que el polen de arándano es liberado en forma de tétradas, se consideró como unidad de conteo la tétrada de polen y la identidad del mismo fue corroborada con preparados de referencia de ambos cultivares. En la cuantificación no se tuvo en cuenta la presencia de otros tipos de pólenes.

### **3.2.4.3 Constancia floral**

Por último, dado que la producción de frutos de arándano se ve beneficiada por la polinización cruzada entre cultivares (Müller *et al.*, 2012), se evaluó la constancia floral de las recolectoras en cada cultivar. Se siguieron a los individuos de ambas especies durante sus sucesivas visitas hasta un tiempo máximo de 10 minutos, registrando si alternaban entre los cultivares o no, de manera de calcular el porcentaje de recolectoras constantes en cada cultivar. Se consideraron para el análisis aquellas observaciones en las que la recolectora focal visitó al menos tres flores.

### **3.2.5 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa R v3.6.2 (R Core Team, 2019) y el paquete glmmTMB (Brooks *et al.*, 2017). Las diferencias en las variables morfológicas fueron evaluadas mediante un análisis multivariado de la varianza (MANOVA), seguido de análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, en el cual el cultivar fue el factor fijo (dos niveles). Se excluyó de este análisis la distancia entre anteras y estigma debido a que las muestras no estaban balanceadas y problemas de colinearidad. Para esta última variable, se propuso un modelo lineal generalizado (GLM) con estructura de error Gaussiana. Para reducir el riesgo de cometer error de tipo I por el múltiple uso

de los mismos datos, el nivel de significancia fue corregido usando el método de Bonferroni ( $\alpha' = \alpha/k$ ), con  $\alpha = 0,05$  y  $k = 4$ . De esta manera, el nuevo nivel de significancia que se tuvo en cuenta para el análisis de las variables morfológicas fue  $\alpha' = 0,0125$ .

La disponibilidad instantánea de néctar (volumen y concentración) fue analizada mediante GLMs con estructura de error Gaussiana y cultivar (dos niveles) como factor fijo. Para evaluar diferencias en la producción de néctar (volumen y concentración) se plantearon modelos lineales generalizados (GLMM), con estructura de error Gaussiana, incluyendo como factores fijos el cultivar (dos niveles) y la edad de la flor (tres niveles), y como factor aleatorio la rama debido a la dependencia de los datos.

Para descartar cualquier diferencia en la densidad de polinizadores entre las dos zonas del campo seleccionadas, inicialmente se incluyó la zona como factor fijo en el modelo, pero luego fue removido ya que su efecto no resultó significativo ( $p > 0,05$ ). Para evaluar el número de individuos de cada especie por transecta se propuso un GLMM con estructura de error binomial negativa (debido a la sobre-dispersión de los datos). El modelo máximo incluyó la interacción entre los factores año (dos niveles) y especie (dos niveles), y el cultivar (dos niveles) y la proximidad a un nido de abejorros (dos niveles) como factores fijos, mientras que la transecta se incluyó como factor aleatorio.

Para analizar diferencias entre cultivares y especies en el número de flores visitadas, se propuso un GLMM con estructura de error binomial negativa (debido a la sobre-dispersión de los datos), el cual incluyó el cultivar (dos niveles) y la especie (dos niveles) como factores fijos, y el logaritmo del tiempo de observación como offset. El tipo de recurso recolectado (sólo néctar o polen) fue analizado mediante un GLMM con estructura de error binomial Bernoulli, incluyendo la interacción entre los factores especie (dos niveles) y cultivar (dos niveles), el año (dos niveles) y el momento del día (dos niveles) como factores fijos, y la transecta como factor aleatorio. Con el objetivo de analizar una muestra de datos balanceada para cada año se generó de manera aleatoria un subconjunto de la base de datos total de transectas.

La carga de polen en el cuerpo fue analizada con un GLMM con estructura de error binomial negativa (debido a la sobre-dispersión de datos), e incluyó la interacción entre los factores especie (dos niveles) y tipo de recolectora (dos niveles). Para evaluar diferencias entre las regiones del cuerpo se repitió el análisis considerando la interacción entre los factores especie (dos niveles) y región del cuerpo (tres niveles), con el individuo como factor aleatorio para dar cuenta de la dependencia de los datos. Se realizaron comparaciones *a posteriori* utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2020).

La constancia floral fue evaluada mediante un GLMM con estructura de error binomial Bernoulli (constantes /no constantes), considerando el cultivar (dos niveles), la especie (dos niveles) y el momento del día (dos niveles) como factores fijos, y el logaritmo del número de flores visitadas como offset.

En todos los modelos se inspeccionó la distribución de los residuos, evaluando casos de sobre- o sub-dispersión, o casos de variables infladas en cero, mediante la simulación de residuos predichos utilizando el paquete DHARMA (Hartig, 2020). La significancia de los distintos factores fijos de los modelos fue evaluada partiendo del modelo máximo propuesto mediante la función *anova* para comparar entre modelos anidados (Chambers y Hastie, 1992). Los factores fijos no significativos ( $p > 0,05$ ) fueron removidos del modelo máximo (ver Anexo B Tabla B2).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Caracterización de los cultivares de arándano

Los dos cultivares de arándano estudiados difirieron en su morfología floral (Tabla 3.1). El análisis MANOVA arrojó diferencias globales significativas entre flores Emerald y San Joaquín (Lambda de Wilks:  $F_{3,105} = 20,997$   $p < 0,001$ ). Los subsiguientes análisis de ANOVA revelaron que las flores San Joaquín presentaron un diámetro de apertura de corola menor que las flores Emerald ( $F_{1,107} = 24,8$   $p < 0,001$ ), y su corola resultó más corta ( $F_{1,107} = 7,0$   $p < 0,01$ ) y más estrecha ( $F_{1,107} = 63,0$   $p < 0,001$ ).

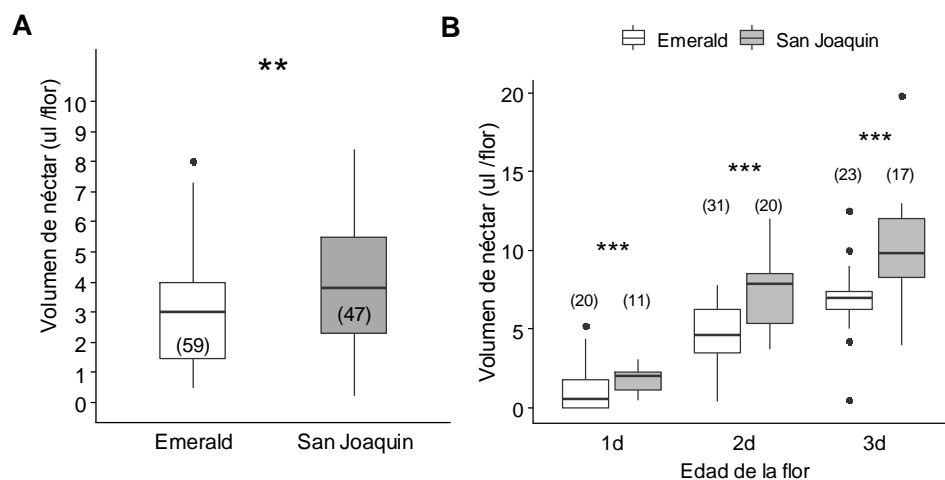
**Tabla 3.1. Morfología floral de los cultivares de arándano Emerald y San Joaquín.** Ambos cultivares presentaron diferencias en los tres caracteres florales evaluados. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre cultivares ( $p < 0,0125$ ).

Cultivar	N	Diámetro de apertura de corola (mm; media ± E.E.)	Largo de corola (mm; media ± E.E.)	Ancho de corola (mm; media ± E.E.)	Distancia entre anteras y estigma (mm; media ± E.E.)
Emerald	55	3,82 ± 0,06 a	8,87 ± 0,07 a	8,50 ± 0,07 a	1,54 ± 0,05 a
San Joaquín	54	3,45 ± 0,05 b	8,62 ± 0,07 b	7,67 ± 0,08 b	1,62 ± 0,06 a

Por otra parte, la disponibilidad de néctar varió entre ambos cultivares (Figura 3.4A). El volumen de néctar ofrecido por flores San Joaquín fue significativamente mayor que aquel de flores Emerald (media ± E.E., SJ:  $4,0 \pm 0,3$   $\mu\text{l}/\text{flor}$ , N = 47; EM:  $2,9 \pm 0,2$   $\mu\text{l}/\text{flor}$ , N = 59;  $\chi^2_1 = 8,32$   $p < 0,01$ ), aunque la concentración estimada de azúcares fue similar entre ambas (media ± E.E., SJ:  $19 \pm 1\%$  p/p, N = 33;



EM:  $20 \pm 1\%$  p/p, N = 32; cultivar:  $\chi^2_1 = 1,67$  p = 0,1966). Asimismo, la producción de néctar de flores embolsadas presentó diferencias significativas entre cultivares (Figura 3.4B). Las flores San Joaquín ofrecieron volúmenes de néctar mayores que flores Emerald (EM vs SJ: LR = 18,11 p < 0,001). Además, en ambos casos se vio un aumento progresivo del volumen de néctar durante los tres días evaluados (factor *edad de la flor*: LR = 98,95 p < 0,001; comparaciones *a posteriori*: flores de 1 día vs de 2-días: p < 0,001; flores de 2 días vs de 3 días: p < 0,001; flores de 1 día vs de 3 días: p < 0,001). En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre cultivares en la concentración estimada de azúcares de las flores embolsadas (media  $\pm$  E.E., SJ:  $59 \pm 1\%$  p/p, N = 47; EM:  $60\% \pm 1\%$  p/p, N = 60; factor *cultivar*: LR = 1,38 p = 0,2399).

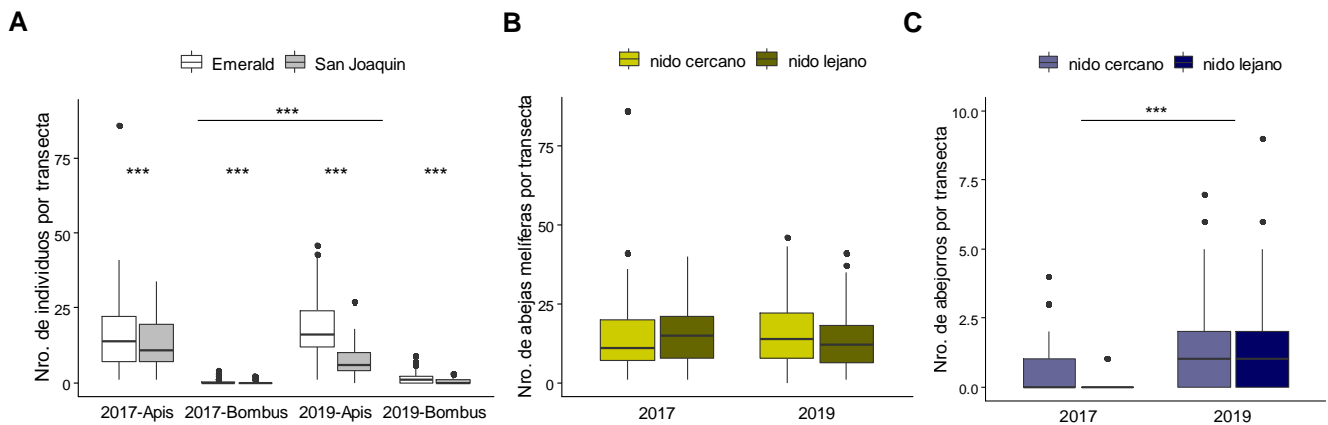


**Figura 3.4. Producción de néctar de los cultivares Emerald y San Joaquín.** (A) Disponibilidad instantánea de néctar (standing crop) en ambos cultivares. Las flores San Joaquín ofrecieron un mayor volumen de néctar. (B) Patrón de producción de néctar durante los primeros tres días luego de la antesis. Las flores San Joaquín presentaron volúmenes mayores de néctar que las Emerald en las tres edades de flor evaluadas. Diagramas de caja donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Los asteriscos señalan diferencias significativas (\*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001). Se indica entre paréntesis el tamaño muestral.

### 3.3.2 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* a escala poblacional

Al evaluar la densidad de ambas especies de polinizadores en el cultivo, el número de abejas melíferas por transecta resultó ampliamente superior al de abejorros (Figura 3.5A). El análisis reveló un efecto significativo de la interacción entre la especie y el año (LR = 53,7 p < 0,001); mientras que la densidad de abejas melíferas no varió entre las dos temporadas (2017:  $15,4 \pm 1,0$  individuos por transecta; 2019:  $14,6 \pm 0,7$  individuos por transecta; comparación *a posterior* 2017 vs 2019: Ratio  $F_{1,730}$

= 0,8  $p = 0,3673$ ), la densidad de abejorros se vio modificada por el año (comparación *a posteriori* 2017 vs 2019: Ratio  $F_{1,730} = 43,2$   $p < 0,001$ ). La abundancia de abejorros en 2019 resultó más de tres veces mayor que en 2017, lo cual fue consistente con un mayor número de nidos contratados en 2019 (2017:  $0,4 \pm 0,1$  individuos por transecta; 2019:  $1,2 \pm 0,1$  individuos por transecta). Al considerar las densidades en cada cultivar, se encontró un número mayor de individuos visitando flores Emerald (EM vs SJ: LR = 32,96  $p < 0,001$ ). Por otro lado, al tener en cuenta la distribución de nidos de abejorros, la densidad de polinizadores no se vio modificada por la proximidad a un nido (Figura 3.5B, C; factor *nido*: LR = 1,21  $p = 0,2715$ ).



**Figura 3.5. Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* a nivel poblacional en los cultivares Emerald y San Joaquín. (A) Número de individuos por transecta. La densidad de abejas melíferas fue ampliamente superior a la de abejorros sin diferir entre ambos años. (B,C) Número de abejas melíferas (B) y de abejorros (C) por transecta, en función de la cercanía a un nido de abejorros. La densidad de abejas melíferas difirió entre cultivares, pero no fue modificada por la proximidad a un nido de *B. pauloensis*. El número de abejorros se incrementó en 2019, con una mayor densidad de colonias, aunque no se vio influenciado por la cercanía de un nido. Diagramas de caja, donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Los asteriscos señalan diferencias significativas (\*\*\*,  $p < 0,001$ ). (N = 369 transectas).**

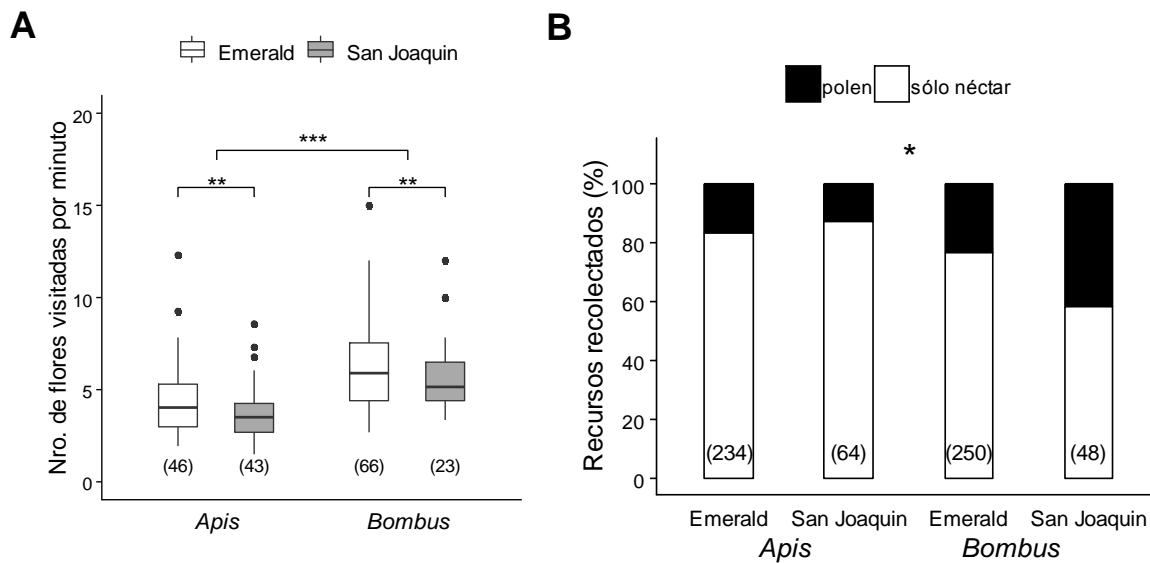
### 3.3.3 Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* a escala individual

#### 3.3.3.1 Número de flores visitadas y recursos recolectados

Ambas especies de polinizadores se diferenciaron en su comportamiento recolector individual (Figura 3.6). Por un lado, *B. pauloensis* visitó un mayor número de flores de arándano por unidad de tiempo que *A. mellifera* (Figura 3.6A, media  $\pm$  E.E., *Bombus*:  $6,1 \pm 0,3$  flores por minuto; *Apis*:  $4,1 \pm 0,2$  flores por minuto; *Apis* vs *Bombus*: LR = 39,37  $p < 0,001$ ). Además, las flores del cultivar Emerald fueron

visitadas por ambas especies en mayor medida que las del cultivar San Joaquín (*EM vs SJ*: LR = 7,47  $p < 0,01$ ).

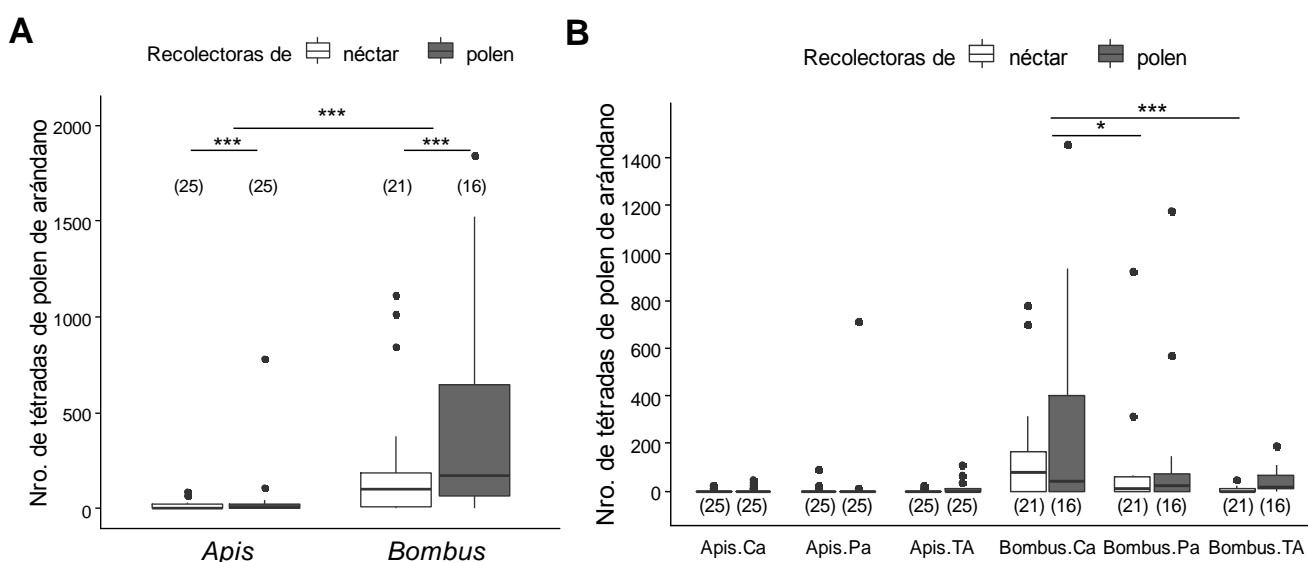
Además, se encontraron diferencias en la recolección de recursos (Figura 3.6B). A pesar de que la mayoría de los individuos recolectaron exclusivamente néctar en ambos cultivares, se observó una interacción significativa entre la especie y el cultivar (LR = 5,40  $p < 0,05$ ). Mientras que la proporción de abejas melíferas recolectando néctar no difirió entre cultivares (comparación *a posteriori EM vs SJ*: Ratio  $F_{1,589} = 0,42$   $p = 0,5193$ ), una mayor proporción de abejorros visitando flores San Joaquín portaban cargas corbiculares de polen (comparación *a posteriori EM vs SJ*: Ratio  $F_{1,589} = 6,60$   $p < 0,05$ ). Por otra parte, el tipo de recurso recolectado no se vio influenciado por el año o por el momento del día (comparaciones *a posteriori*: 2017 vs 2019: Ratio  $F_{1,589} = 0,34$   $p = 0,5582$ ; mañana vs tarde: Ratio  $F_{1,589} = 0,45$   $p = 0,5026$ ). Todas las visitas registradas fueron legítimas y no se observó daño floral, lo cual sugiere que no hubo casos de robo de néctar.



**Figura 3.6. Patrón de recolección de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* a nivel individual en los cultivares Emerald y San Joaquín. (A) Número de flores visitadas por minuto por ambas especies. Los abejorros visitaron un mayor número de flores por minuto que las abejas melíferas, siendo las flores Emerald más visitadas por ambas especies. Diagramas de caja, donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. (B) Recursos recolectados por ambas especies (EM: Emerald; SJ: San Joaquín). Los abejorros recolectaron polen en mayor proporción que las abejas melíferas en ambos cultivares. Los asteriscos señalan diferencias significativas (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Se indica entre paréntesis el tamaño muestral.**

### 3.3.3.2 Carga de polen de arándano en el cuerpo de las recolectoras

En relación a las cargas de polen en el cuerpo de los polinizadores, se encontró que los abejorros *B. pauloensis* portaban aproximadamente 10 veces más polen de arándano que *A. mellifera* (Figura 3.7). Al analizar la carga total por individuo, se encontró un efecto aditivo de la especie y del tipo de recolectora, no resultando significativa su interacción (LR = 0.894,  $p = 0.3443$ ). Las recolectoras de polen de ambas especies presentaron una mayor cantidad de polen de arándano en sus cuerpos (considerando las tres regiones evaluadas) que las recolectoras de néctar (Figura 3.7A, *Apis* vs *Bombus*: LR = 37,27  $p < 0,001$ ; recolectoras de néctar vs polen: LR = 7,73  $p < 0,01$ ).



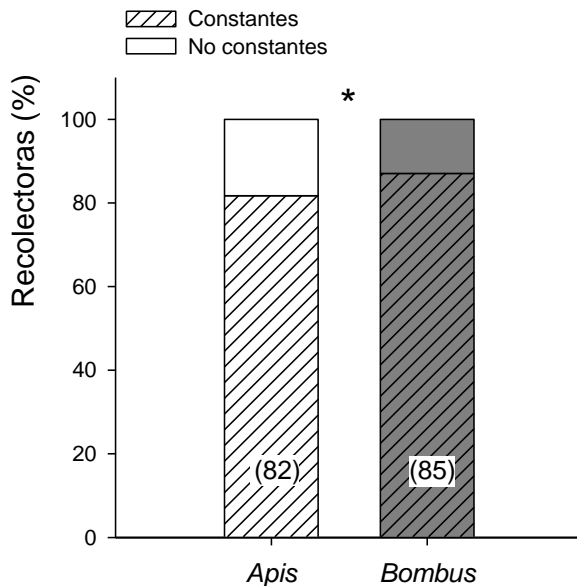
**Figura 3.7. Carga de polen de arándano en el cuerpo de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis*, excluyendo sus cargas corbiculares. (A) Número total de tetradas en función de la especie y del tipo de recolectoras. Los abejorros portaban una carga de polen de arándano 10 veces mayor que las abejas melíferas, cuantificándose un número mayor de tetradas en recolectoras de polen que en aquellas de néctar. (B) Número total de tetradas en función de la especie y de la región del cuerpo (CA, cabeza; Pa, patas; TA, tórax-abdomen), distinguiendo el tipo de recolectoras. Mientras los abejorros portaban más polen de arándano en sus cabezas, el número de tetradas de las abejas melíferas resultó similar en las tres regiones del cuerpo evaluadas. Diagramas de caja, donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Los asteriscos señalan diferencias significativas (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Se indica entre paréntesis el tamaño muestral.**

Por otra parte, el análisis de la carga de polen considerando tres regiones principales del cuerpo reveló la interacción significativa entre la especie y la región considerada (Figura 3.7B; especie\*región: LR = 12,87  $p < 0,001$ ). Mientras no se encontraron diferencias significativas en el número de tetradas de polen en las tres regiones del cuerpo de las abejas melíferas, los abejorros presentaron mayor

cantidad de polen de arándano en sus cabezas (comparaciones *a posteriori* para *Bombus*: *cabeza vs patas*: ratio = 3,4 s.e. = 1,5 ratio.t = 2,8 p < 0,05; *cabeza vs tórax-abdomen*: ratio = 9,2 s.e. = 4,2 ratio.t = 4,9 p < 0,001). La cantidad de polen cuantificada en la región de la cabeza de abejorros fue el doble que la presente en las patas y sobrepasó en más de ocho veces la cantidad hallada en la región del tórax-abdomen (media ± E.E.: *cabeza*: 202 ± 53 tétradas; *patas*: 102 ± 42 tétradas; *tórax-abdomen*: 23 ± 7 tétradas).

### 3.3.3.3 Constancia floral

Por último, para evaluar la constancia floral de ambas especies, se monitorearon un total de 82 abejas melíferas y 85 abejorros mientras visitaban en promedio (media ± E.E., rango) 10,7 ± 0,9 (3-41) y 18,2 ± 1,7 (3-73) flores de arándano, respectivamente. Al evaluar las sucesivas visitas de los polinizadores y la potencial transferencia entre los dos cultivares, ambas especies exhibieron una alta fidelidad al cultivar visitado (≥80%), sin importar la identidad del mismo (Figura 3.8, *EM vs SJ*: LR = 0,06 p = 0,8022). Sin embargo, la proporción de abejorros visitando sucesivamente el mismo cultivar resultó significativamente mayor que la proporción de abejas melíferas (*Apis vs Bombus*: LR = 4,3 p < 0,05). Es decir, las abejas melíferas resultaron más propensas a alternar entre flores Emerald y San Joaquín que los abejorros.



**Figura 3.8. Constancia floral de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* en los cultivares Emerald y San Joaquín.** El porcentaje de individuos recolectando de manera exclusiva en el mismo cultivar se representa con líneas diagonales (constantes). El porcentaje de recolectoras que alternaron entre cultivares se representa con colores plenos (no constantes). Si bien ambas especies exhibieron alta constancia floral, las abejas melíferas resultaron más propensas a alternar entre cultivares que los abejorros. El asterisco señala diferencias significativas (\*, p < 0,05). Se indica entre paréntesis el tamaño muestral.

### 3.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que las abejas *Apis mellifera* y los abejorros nativos *Bombus pauloensis* difieren en sus patrones de recolección en una plantación mixta de arándano 'Southern highbush', cultivares Emerald y San Joaquín bajo macrotúneles. Tanto la abundancia de ambos polinizadores visitando el cultivo como su comportamiento individual en las flores, se vieron influenciados por la identidad del cultivar, diferenciándose ambos en su morfología floral y oferta de néctar. A escala poblacional, el número de abejas melíferas visitando el cultivo superó ampliamente el de abejorros, sin verse modificada por la densidad de colmenas introducidas en cada año, ni por la cercanía a un nido de abejorros. Por el contrario, un mayor número de nidos de abejorros introducidos en 2019 resultó en un aumento en la densidad de individuos recolectores de esta especie en el cultivo. A escala individual, *B. pauloensis* visitó un mayor número de flores por unidad de tiempo que *A. mellifera*, y una mayor proporción de individuos recolectaron polen durante todo el día. Además, los abejorros llevaban diez veces más cantidad de polen de arándano adherido en su cuerpo que las abejas melíferas, especialmente las recolectoras de polen. Por último, aunque ambas especies de polinizadores presentaron alta constancia floral en este cultivo, las abejas melíferas fueron más propensas a alternar entre ambos cultivares que los abejorros, promoviendo en consecuencia la polinización cruzada.

#### *Morfología floral y oferta de néctar de los cultivares*

Los dos cultivares evaluados se diferenciaron en su morfología floral (Tabla 3.1). Las flores Emerald presentaron un diámetro de apertura de corola significativamente mayor que las flores San Joaquin, lo cual facilitaría el acceso de los polinizadores a las recompensas florales. Si bien sus corolas resultaron más largas, la diferencia entre cultivares fue menor a 1 mm. A pesar de que el largo funcional de la probóscide de las abejas melíferas (Waddington y Herbst, 1987) es menor al largo total de las corolas de ambos cultivares (7,0 mm y 8,7 mm en promedio, respectivamente), las abejas podrían acceder a los nectarios basales dada la flexibilidad del tejido de la corola. Por otro lado, las probóscides más largas de *B. pauloensis* (8,7 mm) se ajustarían mejor a las flores de arándano y les permitirían recolectar néctar más rápidamente.

Siguiendo la clasificación funcional propuesta por Corbet (2006), la cual considera tanto la cantidad de néctar ofrecido y su accesibilidad como las características anatómicas y fisiológicas de los visitantes florales, las flores de arándano pueden ser consideradas de tipo hemifilas, dado que ofrecen volúmenes moderados de néctar parcialmente escondido y que suelen ser visitadas por abejas de probóscide corta entre otros insectos. Si bien los dos cultivares estudiados presentaron una alta

producción de néctar durante toda la antesis, el volumen ofrecido de néctar fue mayor en las flores San Joaquín, cuyas corolas más estrechas podrían dificultar la evaporación (Figura 3.4). Por otra parte, otra característica del néctar que influye en la atracción de polinizadores es su calidad, por ejemplo, en términos del contenido de azúcares. Los resultados obtenidos muestran que la concentración estimada de azúcares del néctar fue similar en ambos cultivares al evaluar, tanto en flores visitadas como en flores embolsadas.

#### *Patrón de recolección a escala poblacional*

A escala poblacional, las abejas melíferas fueron los principales visitantes del cultivo en los dos años evaluados, superando ampliamente la densidad de abejorros (en más de diez veces en cada año; Figura 3.5). Llamativamente, el número de abejas recolectoras no se vio modificado por el año aunque la densidad de colmenas en 2019 fue 3,5 veces mayor a la de 2017. A pesar de que los productores introdujeron 20 colmenas por hectárea, no se evidenció una mayor densidad de abejas visitando el cultivo. Estos resultados concuerdan con otros estudios que reportan una pobre correlación entre la densidad de colmenas y la abundancia de abejas en plantaciones de arándano (Benjamin y Winfree, 2014; Gibbs *et al.*, 2016), lo cual podría deberse a bajos niveles de actividad recolectora de las colonias o a la presencia de flora alternativa competitiva en los alrededores, aunque durante el mes de julio suelen ser escasas las especies en flor en la región donde se llevó a cabo el estudio. Contrariamente, al aumentar la densidad de colonias de *B. pauloensis* en un factor de 1,5 en 2019, el número de abejorros en el cultivo se incrementó significativamente. Estos resultados concuerdan con la recomendación de utilizar 5-6 nidos por hectárea en servicios de polinización de arándano con especies manejadas de abejorros *Bombus* (*B. impatiens* en arándano 'lowbush' *V. angustifolium*: Stubbs y Drummond, 2001; y *B. pauloensis* en arándano 'highbush': Carlazara *et al.*, 2013). Ahora bien, las densidades efectivas de colonias de ambas especies podrían estar subestimadas, ya que en los lotes vecinos coexistían otros cultivares de arándano que no estaban en flor durante el estudio. Esto es frecuente en las plantaciones de arándano en las cuales los productores plantan varios cultivares diferentes con floraciones sucesivas de manera de maximizar la producción durante la temporada. Por otra parte, la abundancia de ambos polinizadores no se vio afectada por la cercanía de un nido de abejorros, ni se observaron interacciones antagonistas entre ellos en los dos años evaluados. Tampoco se observaron problemas de orientación de los polinizadores bajo la estructura de macrotúneles. En cambio, la abundancia sí se vio influenciada por la identidad del cultivar de arándano. En ambos años, las dos especies de polinizadores fueron más frecuentemente observadas visitando flores Emerald. Dicha preferencia puede deberse a que este cultivar ofrecía un mayor número de flores con recompensas más accesibles para los visitantes (dado el mayor diámetro de apertura de la corola), aun cuando las flores San Joaquín presentaron un mayor volumen de néctar.

En ese sentido, estos resultados son consistentes con los reportados por Courcelles y colaboradores (2013) para cultivares de arándano de tipo 'Northern highbush', y apoyan la hipótesis de que el diámetro de apertura de la corola es el carácter morfológico más relevante para predecir la frecuencia de visitas de las abejas.

#### *Patrón de recolección a escala individual*

Ambos polinizadores también se diferenciaron en su comportamiento recolector individual (Figura 3.6). Los abejorros visitaron un mayor número de flores por unidad de tiempo que las abejas melíferas, lo cual es consistente con el hecho de que sus probóscides más largas les permiten recolectar néctar más rápidamente, y concuerda con otros estudios realizados que también documentaron tiempos de visita más cortos para otras especies de *Bombus* en arándano 'lowbush' respecto de las abejas melíferas (Stubbs y Drummond, 2001; Javorek *et al.*, 2002). Por otro lado, más del 85% de las abejas recolectaron exclusivamente néctar en las flores de ambos cultivares de arándano. La baja proporción de abejas recolectando polen podría explicarse por el bajo contenido de proteína cruda del polen de arándano, el cual está por debajo de los requerimientos nutricionales de las abejas melíferas (13,9%; Somerville, 2001). Como se mencionó en la introducción general, las abejas melíferas son polilécticas y si bien pueden obtener polen de una gran diversidad de plantas, no todos los tipos polínicos cubren sus requerimientos nutricionales, debido a un bajo contenido de proteína cruda o a la deficiencia en algún aminoácido esencial (Somerville, 2001). Estudios en monocultivos de arándano 'lowbush' muestran que las colmenas recolectaban en mayor medida pólenes de otros taxones, y además presentaban menores niveles de cría, probablemente debido a deficiencias nutricionales de los recursos polínicos disponibles en dichos entornos (Girard *et al.*, 2012). Por otro lado, el bajo número de abejas con cargas corbiculares de polen de arándano podría deberse a la dificultad para su recolección ya que *A. mellifera* no vibra las anteras. De todas maneras, se ha documentado en otra especie del género *Vaccinium* que las recolectoras de néctar a pesar de ser polinizadores menos eficientes que las recolectoras de polen a nivel individual, al ser más abundantes contribuían en mayor medida a la polinización (Moquet *et al.*, 2017). En cuanto a *B. pauloensis*, si bien la mayoría recolectó néctar en ambos cultivares, una proporción significativamente mayor portaba cargas corbiculares de polen, en especial, al visitar flores San Joaquín. De esta forma, *B. pauloensis* podría contribuir a la polinización del arándano al presentar tiempos de visita breves y al ser capaz de recolectar mayor cantidad de polen de las anteras porcidas, al igual que otras especies de *Bombus* que mostraron una alta eficiencia de polinización por visita (Rogers *et al.*, 2013).

El comportamiento recolector de un polinizador en la flor determinará la cantidad de polen que incidentalmente se adhiera en su cuerpo y que puede ser luego depositado en el estigma de otra flor.



Al cuantificar la carga de polen de arándano en el cuerpo de las recolectoras capturadas, se encontró que los individuos de *B. pauloensis*, de mayor tamaño corporal y densa pilosidad, llevaban 10 veces más tétradas de polen de arándano que *A. mellifera* (Figura 3.7). Las cantidades absolutas estimadas en el presente estudio resultaron menores a las informadas por otros autores (Dogterom y Winston, 1999; Hoffman et al., 2018). Esto podría deberse a tamaños muestrales menores y a variaciones mínimas en la metodología. A pesar de estas diferencias, nuestros resultados permitieron comparar la carga relativa entre recolectoras de polen y de néctar. Tanto en abejas como en abejorros, las recolectoras de polen llevaron significativamente más tétradas en sus cuerpos que las recolectoras de néctar, evidenciando que el tipo de recurso explotado influencia el modo en que las abejas manipulan las flores y, en última instancia, impacta en la transferencia de polen entre las flores. De todas maneras, las tétradas adheridas en el cuerpo de recolectoras de polen podrían presentar menor adherencia a los estigmas de las flores o menor aptitud germinativa como resultado de la manipulación de las abejas corbiculadas, las cuales por ejemplo humedecen el polen con néctar antes de empaquetarlo para su transporte en estructuras especializadas de sus patas (Parker et al., 2015). Dado que no todas las regiones del cuerpo de los polinizadores entran en contacto con las estructuras reproductivas de las flores de arándano, se analizó el número de tétradas en cada una de las regiones evaluadas (cabeza, patas y tórax-abdomen). Mientras que la carga de polen no difirió entre las regiones del cuerpo de las abejas melíferas, los abejorros presentaron un número significativamente mayor de tétradas de polen en la cabeza. Las recolectoras de néctar introducían su cabeza casi por completo dentro de las corolas de las flores de arándano, lo cual permitiría la potencial transferencia de polen al entrar en contacto con el estigma mientras buscaban alcanzar con la probóscide los nectarios basales de las flores. Asimismo, la cabeza de los abejorros ocupaba casi totalmente la apertura de la corola al posicionarse para vibrar las anteras, lo cual podría explicar la mayor cantidad de tétradas halladas en dicha región también en el caso de las recolectoras de polen.

Para maximizar la producción de frutos en este cultivo, los polinizadores deben transferir polen entre distintos cultivares en sus sucesivas visitas a las flores de arándano. En el sistema estudiado, tanto las abejas melíferas como los abejorros exhibieron una alta fidelidad por el cultivar visitado (superior al 80%, Figura 3.8). Sin embargo, las abejas fueron más propensas a realizar cruzamientos entre cultivares, situación que promueve la ocurrencia de la polinización cruzada. Dogterom y colaboradores (2000) demostraron que las flores de arándano del cultivar Bluecrop (de tipo 'Northern Highbush') requieren 125 tétradas de polen de otro cultivar para una máxima producción de frutos. Ahora bien, considerando la baja cantidad de tétradas de polen halladas en el cuerpo de las abejas recolectoras de néctar en la presente tesis, se requeriría un alto número de visitas para una polinización exitosa. Pese a que la constancia floral ha sido bien documentada en *A. mellifera* y algunas especies de

*Bombus* spp., en general ha sido evaluada a partir de la diversidad de pólenes encontrados en sus cargas corbiculares en ambientes con diversas especies disponibles (Grant 1950; Free 1963, 1970; Waser 1986). En dicho tipo de estudios, se observó que la constancia floral era mayor al aumentar las diferencias entre los tipos florales en cuanto a su morfología y color (Waser, 1986; Chittka *et al.*, 1997). El mismo patrón se verificó para las abejas melíferas en cultivares dimórficos de híbridos de girasol, en los cuales el número de entrecruzamientos resultó menor al acentuarse el dimorfismo entre las líneas parentales (Susic Martin y Farina, 2016; ver Capítulo 2 de esta tesis). Los resultados obtenidos en los cultivares estudiados de arándano muestran que, si bien las flores Emerald y San Joaquín presentaron diferencias en ciertos caracteres morfológicos y en la producción de néctar, la constancia floral de *A. mellifera* y *B. pauloensis* no se vio modificada por la identidad del cultivar. La fidelidad de los polinizadores a un dado cultivar o morfotipo podría reflejar un compromiso entre la cantidad de néctar ofrecido, su accesibilidad, y el número de flores disponibles, ya que las flores Emerald ofrecían menos volumen de néctar que las flores San Joaquín, pero éstas últimas poseían un menor diámetro de apertura de la corola y eran menos numerosas que las primeras. A su vez, los cultivares podrían variar en su fragancia floral o en la calidad de las recompensas, factores que podrían afectar la preferencia de los polinizadores (Wright y Schiestl, 2009) y que no fueron evaluados en el presente estudio. La variabilidad de los volátiles florales y de los metabolitos secundarios presentes en el néctar y el polen ha sido demostrada para ciertos cultivares de arándano (Rodríguez-Saona *et al.*, 2011; Palmer-Young *et al.*, 2019), pudiendo alterar el comportamiento de los polinizadores.

#### *Complementariedad de polinizadores comerciales*

La suplementación de colmenas de abejas melíferas con un segundo polinizador comercial nativo ha mostrado efectos positivos en el rendimiento de cultivos de árboles frutales y de frutos secos (Koh *et al.*, 2018; Pérez-Méndez *et al.*, 2020). No obstante, son escasos los estudios que evalúan el impacto del manejo integrado de *A. mellifera* junto con *B. pauloensis* para la polinización del arándano 'highbush'. Si bien se han reportado incrementos en el rinde y la calidad de frutos en parcelas con ambos polinizadores (Carlazara *et al.*, 2013; Díaz, S.A. *et al.*, 2013; Cavigliasso *et al.*, 2020), este es el primer estudio que documenta los patrones de recolección de ambos polinizadores en una plantación mixta de dos cultivares con distinta morfología floral y oferta de néctar, durante dos años con distintas densidades de colonias por hectárea. El manejo integrado de polinizadores con comportamientos complementarios adquiere relevancia para la producción de arándano en regiones fuera de su área de distribución nativa, donde las comunidades de polinizadores silvestres pueden verse limitadas a unas pocas especies. La contribución de las abejas silvestres al rendimiento de este cultivo ha sido relevada dentro de su área nativa, en la que éstas representaron hasta un 30% de las visitas censadas (Isaacs y Kirik, 2010; Garibaldi *et al.*, 2013; Button y Elle, 2014). Aunque en dichas latitudes las plantas de

arándano florecen en primavera y son visitadas por numerosas especies de abejas nativas, en otras regiones productivas (incluyendo el sistema del presente estudio) se cultivan variedades de floración temprana (invernal) que luego pueden ser cosechadas para el mercado de exportación, anticipándose a otras variedades de arándano del hemisferio norte (Williamson y Lyrene, 2004). Cabe mencionar que el 41% de la producción global de arándano de 2019 residió en países fuera de su área nativa, creciendo sostenidamente en los últimos cinco años (FAOSTAT, 2021). En dichos entornos agrícolas, las poblaciones de abejas silvestres probablemente son reducidas pero podrían promoverse mediante la implementación de áreas de flora nativa adyacentes al cultivo, las cuales actuarían como reservorio de polinizadores silvestres al proveer sitios de nidificación y recursos alimenticios complementarios al cultivo (Garibaldi *et al.*, 2014). Como alternativa, el manejo de polinizadores nativos comerciales que suplementen los servicios de polinización mediados por abejas melíferas serviría como estrategia en aquellas regiones con polinizadores silvestres reducidas.

En síntesis, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que *A. mellifera* y *B. pauloensis* recolectan recursos eficientemente de las flores de arándano de tipo 'Southern highbush' y sugieren que ambos contribuyen positivamente a su polinización de manera complementaria. Mientras que los abejorros mostraron una mayor frecuencia de visitas y una mayor recolección de polen de arándano durante todo el día, las abejas melíferas pudieron compensar las limitaciones que las flores de arándano les imponen gracias a su superioridad numérica. Asimismo, estos resultados aportan evidencia a favor de un manejo integrado de ambas especies para optimizar los servicios de polinización en este cultivo.

# Desarrollo y evaluación del efecto de formulados sintéticos específicos sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de arándano y de kiwi

## 4.1 Introducción

El rol dominante de *Apis mellifera* como polinizador introducido en cultivos agrícolas es indiscutible (McGregor, 1976; Delaplane y Mayer, 2000; Klein et al., 2007). Sin embargo, su eficiencia puede verse limitada en ciertos cultivos, como por ejemplo el arándano, debido a su morfología floral restrictiva (ver Capítulo 3 de esta Tesis), o como el kiwi, una especie funcionalmente dioica que depende de los insectos y del viento para su polinización (Ferguson, 1984; Costa *et al.*, 1993; Vaissière *et al.*, 1996). Con el fin de compensar la baja eficiencia polinizadora de las abejas melíferas en estos dos cultivos los productores suelen contratar un elevado número de colmenas trashumantes (en arándano: en promedio, 6-12 colonias por hectárea, Gibbs *et al.*, 2016; en kiwi: 8 colonias por hectárea, Palmer-Jones y Clinch, 1974). Además, en las plantaciones del kiwi es frecuente la práctica de polinización artificial, manual o mecánica, de modo de maximizar la producción de los frutos (García-Rubio *et al.*, 2015). Sumado a estos factores y frente a la creciente demanda por servicios de polinización y a la pérdida de colmenas tanto a nivel mundial como en Latinoamérica (Aizen y Harder, 2009; IPBES, 2016; Solatina, 2020), resulta de interés desarrollar estrategias alternativas que permitan mejorar el desempeño de las colmenas de abejas melíferas utilizadas para la polinización de cultivos.

Como se ha mencionado en la introducción general, cientos de colmenas son trasladadas de un cultivo a otro para brindar servicios de polinización, debiendo evaluar los recursos disponibles y adecuar su comportamiento recolector en cada nuevo entorno, lo cual conlleva usualmente demoras en el inicio de la actividad recolectora. Luego de cada traslado, las abejas deben aprender las características del nuevo entorno, mostrando una gran plasticidad comportamental para encontrar, discriminar y memorizar las fuentes de recursos más ricas (Menzel, 1999). No obstante, no es frecuente la integración de conocimientos acerca de los procesos cognitivos y comportamentales de los

polinizadores (Baracchi, 2019) ni aspectos de la química floral (Raguso, 2008) como parte de las estrategias de manejo de los polinizadores en función de las particularidades de cada sistema agrícola. Entre los procesos cognitivos implicados en el comportamiento recolector, el aprendizaje de las fragancias florales y la formación de memorias olfativas juegan un papel importante en la explotación de recursos (Chittka y Thomson, 2001). Dichas memorias asociativas pueden establecerse al visitar las flores y recolectar el néctar, pero también mediante interacciones sociales dentro del nido, y pueden persistir durante varios días (Farina *et al.*, 2005, 2007; Grüter *et al.*, 2006, 2009; Arenas *et al.*, 2008; Balbuena *et al.*, 2012a). Así, la circulación de néctar aromatizado entre compañeras de nido permite la rápida propagación de información olfativa específica acerca de los recursos disponibles y ajustar el comportamiento recolector de la colonia de acuerdo con la fluctuación de dichos recursos en el tiempo (Díaz, P.C. *et al.*, 2013).

Con el objetivo de sesgar el comportamiento recolector de las abejas melíferas de manera dirigida y en consecuencia incrementar su eficiencia de polinización, en el Laboratorio de Insectos Sociales (IFIBYNE-UBA-CONICET) en los últimos diez años se ha desarrollado una tecnología basada en la capacidad de las abejas de generalizar y discriminar mezclas sintéticas de olores florales con fragancias naturales de las flores de cultivos de interés. Dentro de esa línea de investigación, se han patentado formulaciones sintéticas específicas que representan versiones simplificadas de las fragancias florales de los cultivos de girasol, manzano, peral y almendro (Farina *et al.*, 2011, 2017, 2018; Farina y Díaz, 2018). El desarrollo de cada formulado específico implica distintas etapas de ensayos de laboratorio y de campo. A modo de ejemplo, la validación del Formulado Girasol incluyó una primera etapa de laboratorio, en la que se vio que las abejas no pueden discriminar la mezcla sintética seleccionada (basada en los perfiles de volátiles florales) del olor natural de flores de girasol en ensayos de condicionamiento olfativo; y una segunda etapa de campo, en la cual se demostró que colmenas estimuladas con alimento aromatizado con el Formulado Girasol muestran un sesgo en su actividad recolectora hacia el cultivo de interés, y en consecuencia, un incremento en su rendimiento (Farina *et al.*, 2020). En particular, el sesgo en las preferencias de las abejas por el cultivo de interés se evidenció en distintas variables relacionadas con la actividad recolectora, tales como una mayor actividad general de las colmenas, un mayor número de danzas de contoneo comunicando el cultivo de girasol y también una mayor densidad de recolectoras visitando las inflorescencias de girasol. Además, se vio una reducción en el tiempo requerido por las colmenas desde su introducción al cultivo hasta el comienzo de la actividad recolectora en el mismo, lo cual podría haberse visto facilitado por el hecho de proveer tempranamente a las abejas de información olfativa relevante en un entorno novedoso (Farina *et al.*, 2020).

La producción nacional de arándano (*Vaccinium corymbosum* y *V. angustifolium*) y de kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*) ha crecido en los últimos años (reportando en 2019 un total de 20 mil y 8 mil toneladas, respectivamente; ABC, 2019; Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2020; FAOSTAT, 2021). Ambos cultivos poseen una alta dependencia de polinizadores (Klein *et al.*, 2007) pero presentan particularidades que limitan la eficiencia polinizadora de las abejas melíferas. La menor eficiencia polinizadora por visita de *A. mellifera* frente otras abejas nativas en el arándano (Javorek *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2013) puede explicarse por la morfología floral restrictiva y la incapacidad de las abejas de vibrar las anteras poricidas. No obstante, la numerosa población de recolectoras de las colonias les permite brindar un adecuado servicio de polinización, siendo el manejo del número y calidad de las colmenas introducidas al cultivo la principal estrategia de mejora de la polinización. Otras estrategias que apunten a la atracción de abejas melíferas podrían orientarse a la selección de cultivares con morfologías florales menos restrictivas o una mayor una producción de néctar (Courcelles *et al.*, 2013; ver Capítulo 3 de esta tesis). Un aspecto menos estudiado que puede afectar la atracción de las abejas y otros polinizadores hacia las flores de arándano son las fragancias florales, para las cuales se ha documentado variabilidad entre distintos cultivares (Rodríguez-Saona *et al.*, 2011).

En el caso del kiwi, existen varios aspectos que pueden dificultar la polinización. En primer lugar, las flores femeninas y masculinas ofrecen abundante pseudopen y polen, respectivamente, pero no producen néctar, lo cual puede disminuir la atracción de abejas melíferas frente a flora nectarífera alternativa de los alrededores (Palmer-Jones y Clinch, 1974; Jay y Jay, 1984). Además, el breve período de floración y las frecuentes condiciones meteorológicas desfavorables (lluvia, granizo, fuertes vientos) pueden limitar las visitas de las abejas y por ende resultar en una polinización deficiente (Palmer-Jones y Clinch, 1974; Clinch, 1984). Sumado a esto, un alto número de granos de polen deben ser transferidos desde las flores masculinas a las flores femeninas para la producción de frutos comercializables (>70g), que contienen unas 700 semillas (Testolin, 1991). El diseño de la plantación y los cultivares polinizadores seleccionados también son relevantes para la polinización de este cultivo. Mientras que el cultivar femenino Hayward es el más distribuido en el mundo y el único disponible en Argentina, existen varios cultivares polinizadores compatibles disponibles en la actualidad, como los clones de Matúa M52, Chieftain 2010 y Tomuri NPP1, todos obtenidos en Nueva Zelanda (David *et al.*, 2020). La proporción entre ambos tipos de cultivares recomendada para sistemas con polinización mediada por abejas y/o viento es de 1 planta masculina por cada 3 plantas femeninas plantadas en la misma hilera, aunque existen otros esquemas de plantación con relación 1:7 y hasta 1:13, respectivamente (Costa *et al.*, 1993; Vaissière *et al.*, 1996; Goodwin *et al.*, 1999). Como ya se ha mencionado, estas particularidades del cultivo lleva a los productores a introducir altas densidades de

colmenas, siendo frecuente la práctica de polinización artificial al final de la floración para maximizar el rendimiento (Hopping y Hacking, 1983; King y Ferguson, 1991).

Estudios previos del comportamiento de las abejas melíferas en plantaciones de kiwi muestran que las abejas visitan en mayor medida las flores femeninas que las flores masculinas (Palmer-Jones y Clinch, 1974; Goodwin y Steven, 1993), aunque dicha preferencia puede variar entre temporadas (Clinch, 1984). A pesar de que el polen de las flores femeninas no es viable (pseudopolen) y no tendría valor nutricional (Schmid, 1978; Jay y Jay, 1993), las abejas lo recolectan activamente. Se ha propuesto que los estambres de las flores femeninas cumplen un rol importante en la atracción de polinizadores, habiendo sido demostrado en otras especies del género *Actinidia* (Kawagoe y Suzuki, 2004). La liberación del polen difiere levemente entre ambos tipos florales: mientras que el polen de las flores masculinas es liberado durante tres días, es seco y se dispensa fácilmente en forma de polvo, el de las flores femeninas se libera de forma más gradual durante cinco días y permanece adherido en cúmulos a la pared de las anteras, debiendo ser raspado por las abejas (Goodwin, 1986). Estas diferencias podrían afectar el comportamiento recolector de las abejas en cada tipo floral. Por otra parte, las abejas podrían utilizar claves olfativas para discriminar entre ambos tipos florales. Los análisis de los perfiles de volátiles flores femeninas (cultivar Hayward) y masculinas (de distintos cultivares) no muestran grandes diferencias cualitativas, aunque sí revelan diferencias cuantitativas en ciertos compuestos (Twidle *et al.*, 2015, 2017). A partir de los compuestos identificados en los extractos florales mediante cromatografía gaseosa acoplada a electroantodetección, Twidle y colaboradores (2015) evaluaron mezclas sintéticas de seis compuestos que eran detectados por las abejas y observaron que las abejas condicionadas olfativamente bajo el paradigma de REP a las mezclas sintéticas de cada tipo floral respondían de manera similar frente a los extractos naturales de flores de ambos tipos. Esto indicaría que las abejas no son capaces de discriminar entre las flores femeninas y masculinas mediante claves olfativas. Sin embargo, serían necesarios estudios adicionales acerca de la percepción olfativa de las abejas de distintos cultivares para una mejor comprensión del rol de las fragancias florales en el reconocimiento y discriminación de las flores de kiwi.

En este capítulo, se propone el desarrollo de formulados sintéticos específicos a partir de los perfiles de volátiles florales que apunten a sesgar el comportamiento recolector de las abejas melíferas hacia los cultivos de arándano y de kiwi, dada la alta dependencia de polinizadores de ambos cultivos y la limitada eficiencia polinizadora de *Apis mellifera* en estos dos sistemas. En una primera etapa, se plantea determinar los volátiles presentes en flores de distintas variedades de arándano y de kiwi, y en base a éstos evaluar la capacidad de las abejas melíferas de discriminar entre las mezclas candidatas y los olores naturales en condicionamientos olfativos. En una segunda etapa, se plantea estudiar el

efecto de la estimulación olfativa con el formulado sintético específico seleccionado en colmenas utilizadas para servicios de polinización. Para ello se evaluaron distintas variables relacionadas con la actividad recolectora de las abejas (como la actividad general de las colmenas y la recolección de polen), con el desarrollo de las colmenas (como el área de cría y de reservas), así como con el rendimiento de los cultivos (como el porcentaje de frutos cuajados).

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Desarrollo y evaluación del Formulado Arándano**

#### **4.2.1.1 Sitios de estudio, animales y olores puros**

Las colectas de volátiles se realizaron durante julio de 2017 en una plantación de arándano (*Vaccinium corymbosum*, cultivares Emerald y San Joaquín) en el establecimiento La Fe (27°56'45"S, 56°5'30"O), ubicada en la cercanía de la localidad de Gobernador Virasoro, en la provincia de Corrientes, Argentina. Por otro lado, se realizaron colectas adicionales en otros sitios (cultivar Snowchaser en julio de 2017 en una plantación cercana a la localidad de Concordia, provincia de Entre Ríos, y cultivar Emerald en agosto de 2018 en una plantación cercana a la localidad de San Pedro, provincia de Buenos Aires) con el fin de evaluar diferencias entre cultivares. La obtención de los cromatogramas fue realizada utilizando los equipos del Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Con el objetivo de evaluar distintas mezclas sintéticas candidatas propuestas a partir de los perfiles de volátiles se realizaron ensayos de condicionamiento olfativo absoluto durante los meses de julio a septiembre de 2016 y de 2017 con abejas de colmenas del apiario del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, ubicado en Ciudad Universitaria (34°32'S, 58°26'O).

Los olores utilizados en las distintas mezclas sintéticas evaluadas para el desarrollo del Formulado Arándano (FA) son compuestos que están presentes en las fragancias florales de gran cantidad de angiospermas (Knudsen *et al.*, 1993); y fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania. Los detalles de la composición de las mezclas forman parte de una solicitud de patente aún no publicada. Por motivos inherentes al negocio potencial, en esta tesis se excluye la difusión de información detallada al respecto.



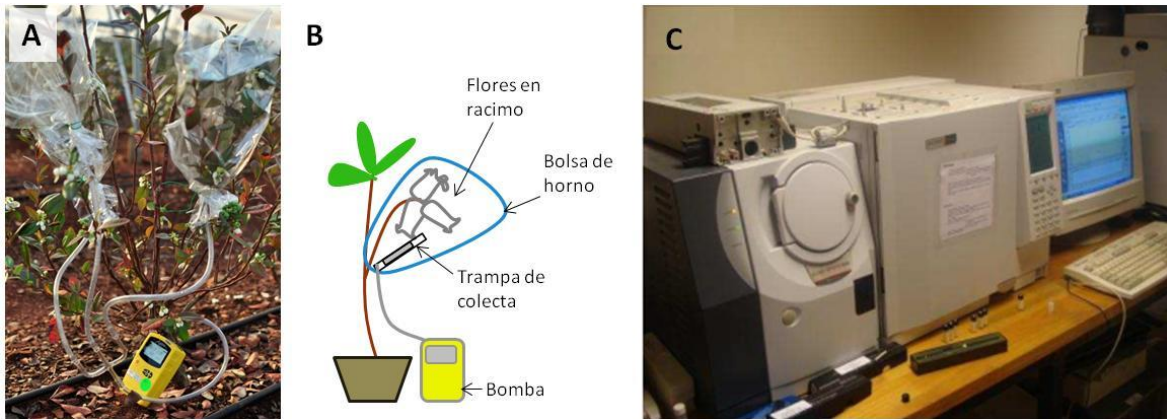
Los ensayos de campo para la evaluación del efecto de la estimulación con FA en la actividad recolectora y desarrollo de las colmenas fueron realizados durante agosto de 2018 en una plantación de arándano (*V. corymbosum*, cultivares Emerald y O'Neal) ubicada en la cercanía de la localidad de San Pedro (33°47'48"S, 59°44'13"O), en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se utilizaron colmenas de abejas melíferas tipo Langstroth distribuidas en tres grupos ubicados en los bordes del cultivo para brindar servicios de polinización (ver Anexo A Figura A3). Cada colmena contó con 10 cuadros, una reina fecundada, dos cuadros de cría en promedio, limitada reserva de alimento y alrededor de 15.000 individuos.

Los ensayos de campo para la evaluación del efecto de la estimulación con FA en el rendimiento del cultivo fueron realizados durante julio de 2019 en una plantación de arándano (*V. corymbosum*, cultivar Emerald) ubicada en la cercanía de la localidad de Concordia (31°26'57"S, 58°6'8"O), en la provincia de Entre Ríos, Argentina. Se utilizaron colmenas de abejas melíferas tipo Langstroth ubicadas en los bordes del cultivo para brindar servicios de polinización (ver Anexo A Figura A4A). Cada colmena contó con 8-9 cuadros, una reina fecundada, dos cuadros de cría en promedio, limitada reserva de alimento y alrededor de 15.000 individuos. Durante agosto y septiembre de 2019, se realizaron ensayos similares con otros cultivares en una plantación de arándano (*V. corymbosum*, cultivares Misty y O'Neal) en el establecimiento La Margarita, ubicado en la cercanía de la localidad de Parada Robles (34°23'21"S, 59°9'22"O), en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se utilizaron colmenas de abejas melíferas tipo Langstroth ubicadas en los bordes del cultivo para brindar servicios de polinización (ver Anexo A Figura A4B). Cada colmena contó con 9 cuadros, una reina fecundada, limitada reserva de alimento y alrededor de 15.000 individuos y un melario de media alza.

#### **4.2.1.2 Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de arándano**

Se realizaron las colectas de compuestos volátiles *in vivo* en plantas de los cultivares Emerald y San Joaquín. Se seleccionaron y embolsaron ramas con 10-15 flores recientemente abiertas y/o capullos. Se utilizaron bolsas de polietileno, cada una de las cuales encerraba una pipeta Pasteur de vidrio conteniendo 100 mg de polímero adsorbente HaySep-Q 80/100 mesh (HaySep-Q® Q, Sigma-Aldrich) que actuó como trampa para la colecta de compuestos volátiles mediante la técnica de muestreo de espacio de cabeza (headspace) dinámico. Se utilizó una bomba succionadora de aire (Casella Cel, Apex Standard, Reino Unido) conectada mediante una división de vidrio en forma de tridente a tres trampas, realizando tres colectas en simultáneo (Figura 4.1, A y B). La corriente de aire fue de 1,6

L/min) y la colecta duró un período de 7 horas (entre las 10 y 17 hs, coincidiendo con el período diario de actividad recolectora de los polinizadores).



**Figura 4.1. Colecta y análisis de volátiles *in vivo* de plantas de arándano.** (A) Dispositivo formado por una bomba succionadora de aire conectada mediante una división de vidrio a tres trampas de colecta (pipeta Pasteur) sujetas cada una a una rama portando flores recién abiertas. (B) Esquema simplificado representando una rama con tres flores en racimo embolsada junto a la trampa de colecta conteniendo un polímero adsorbente, conectada a la bomba de succión. (C) Equipo de cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas perteneciente al Laboratorio de Ecología Química (UdelaR, Montevideo, Uruguay). Crédito fotográfico: INSSOC.

Los volátiles adsorbidos en las trampas de colecta fueron eluidos con 2 ml de hexano (Sigma-Aldrich), y luego almacenados a  $-4^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Las trampas de colecta fueron lavadas posteriormente con 10 ml de dos solventes de diferente polaridad (metanol y hexano, en ese orden) para su reutilización.

La colecta de volátiles del cultivar Snowchaser fue realizada mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME, en inglés). En este caso, se utilizó una fibra adsorbente de volátiles (SUPELCO SPME Portable, Field Sampler con recubrimiento de polidimetilsiloxano, PDMS), la cual fue embolsada junto una rama con flores recién abiertas y expuesta por un período de 7,5 horas.

Los análisis de CG-EM fueron realizados en un cromatógrafo de gases QP-2010 (Shimadzu Corp, Japón) equipado con una columna apolar (AT-5MS,  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ ,  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ , Alltech, E.E.U.U.). El inyector fue operado en modo *splitless* con un flujo del gas portador (He) de  $1\text{ mL/min}$ . La temperatura inicial del horno fue de  $40^{\circ}\text{C}$  (1 min), y fue llevada a  $280^{\circ}\text{C}$  a  $7^{\circ}\text{C/min}$  (5 min). La temperatura del inyector, la interfase, la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron  $280$ ,  $300$ ,  $200$  y  $150^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. La energía de ionización fue de  $70\text{ eV}$ . La adquisición se realizó desde 30 hasta  $350$

m/z. El volumen de inyección fue 1  $\mu$ L. En caso de ser necesario, previo a la inyección en el cromatógrafo, las muestras fueron concentradas mediante la utilización de rotavapor o por corriente de nitrógeno. En el caso de las fibras SPME, las mismas se inyectaron manualmente en el cromatógrafo. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los espectros de masa obtenidos con los de las bibliotecas NIST05 y SHIM2205 del equipo. El análisis se centró en aquellos compuestos pertenecientes a los grupos isoprenoides, y bencenoides o fenilpropanoides, los cuales son los más distribuidos en las fragancias florales entre los distintos taxones de plantas (Knudsen *et al.*, 1993). No se identificaron los alcanos lineales o ramificados de más de 10 átomos de carbono (indicados como alcanos de cadena larga en el Anexo Figura C1).

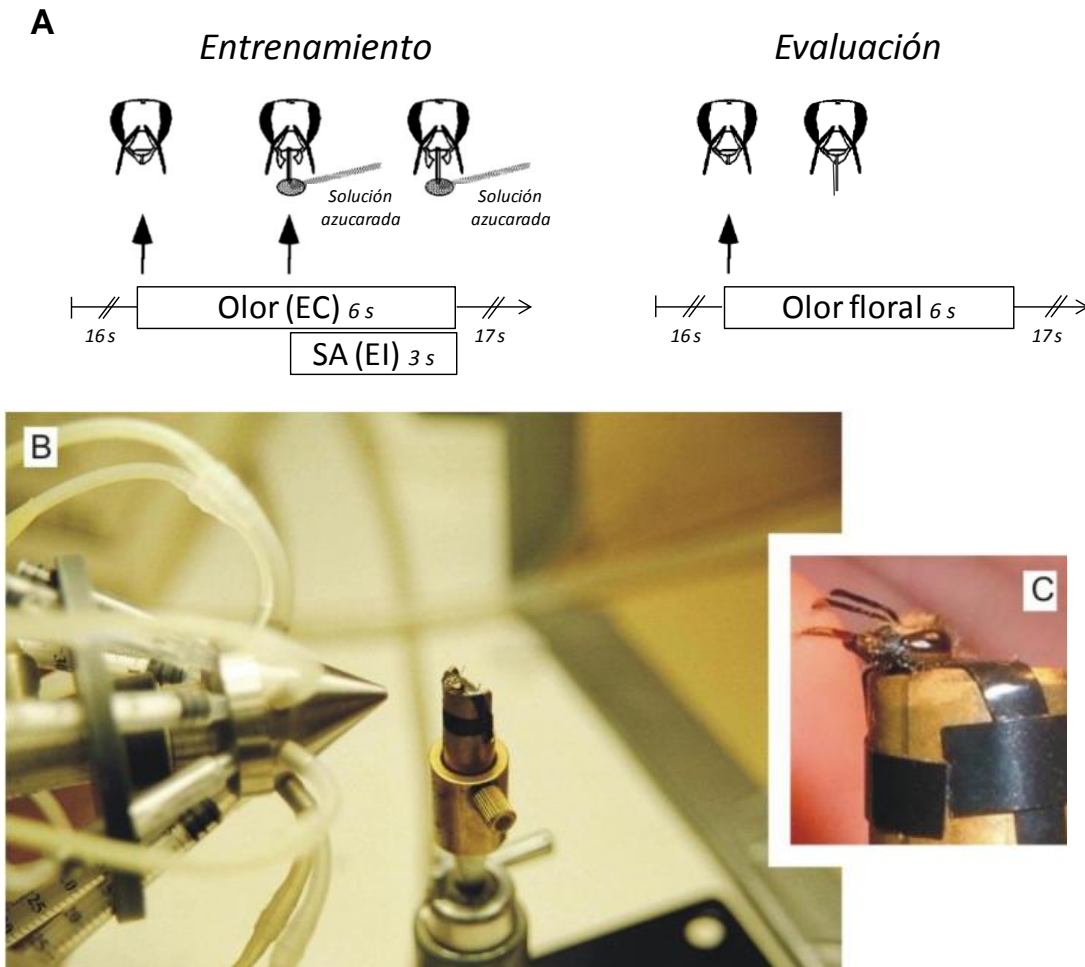
#### 4.2.1.3 Condicionamientos olfativos

Una vez identificados los volátiles presentes en las flores de arándano, se propusieron distintas mezclas sintéticas con el fin de evaluar la capacidad de las abejas para discriminar cada mezcla del olor floral natural mediante condicionamientos olfativos bajo el paradigma de respuesta de extensión de probóscide (REP, Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983). Para ello se capturaron abejas en la entrada de las colmenas, las cuales fueron luego anestesiadas en frío (-4 °C) y amarradas en tubos metálicos, de manera tal que sólo pudieran mover libremente las antenas y las piezas bucales. A continuación se las alimentó con una gota de solución de sacarosa 1,8 M (50% p/p) y se las mantuvo en incubadora (32 °C, 55 % HR y oscuridad) durante dos horas.

Las abejas fueron sometidas a un protocolo de condicionamiento olfativo absoluto (Takeda, 1961; Bitterman *et al.*, 1983), en donde cada una de las mezclas sintéticas fue presentada junto con una recompensa. Los olores ofrecidos como estímulos condicionados (EC) fueron siete mezclas distintas de hasta 3-4 odorantes formuladas a partir de los compuestos presentes en los perfiles de volátiles de las flores de arándano en proporciones variables (solicitud de patente en trámite).

Durante la fase de entrenamiento, se presentó el EC con una solución de sacarosa 50% p/p (estímulo incondicionado, EI). La presentación del olor se realizó mediante un dispositivo con una corriente de aire continua (50 ml/s) apuntado sobre la cabeza de cada abeja ubicada a 2 cm del mismo. Un papel de filtro (30 x 3 mm) fue impregnado con 4  $\mu$ L de la mezcla sintética a evaluar. Los olores fueron entregados por una corriente de aire secundaria (2,5 ml/s), inyectada en la corriente de aire principal al momento de ser presentada ante la abeja. Se colocó un extractor de aire por detrás de la salida de los olores, para evitar la contaminación del ambiente (Fernández *et al.*, 2009). El entrenamiento constó de

3 ensayos, con un intervalo de 15 minutos entre cada uno. Cada ensayo duró 39 s y consistió en 16 s de aire limpio, seguidos de la presentación del olor durante 6 s y de 17 s finales de aire limpio. La recompensa (EI) fue ofrecida durante los últimos 3 s de la presentación del olor (EC), tocando las antenas y luego alimentando a la abeja. Se evaluó la respuesta condicionada (RC) de la abeja, considerándola como positiva si extendía la probóscide durante los primeros 3 s de la presentación del olor (Figura 4.2). Aquellas abejas que extendieron su probóscide en el primer ensayo (respuesta espontánea) no fueron consideradas para el análisis.



**Figura 4.2. Condicionamiento olfativo clásico en *Apis mellifera*.** (A) Esquema del condicionamiento absoluto de la respuesta de extensión de probóscide (REP). En la fase de entrenamiento (panel izquierdo) se presentó un olor (estímulo condicionado, EC) durante 6 segundos apareado a la recompensa de solución azucarada (estímulo incondicionado, EI) durante los últimos 3 segundos. En la fase de evaluación, se presentó el olor floral natural sin recompensa. En ambas fases se evalúa la REP durante los primeros 3 segundos. (Adaptado de Müller, 2002). (B) Dispositivo eléctrico formado por un cañón con sus respectivas válvulas que permiten el paso de un flujo controlado de aire (limpio o con olor), que apunta sobre la cabeza de una abeja amarrada. (C) Detalle de la abeja amarrada en un tubo metálico ubicada frente al dispositivo. Se observa cómo la abeja extiende la probóscide. Crédito fotográfico: INSSOC.

La fase de evaluación fue realizada 15 minutos después del último ensayo y consistió en una única presentación no recompensada del olor natural de flores de arándano (cultivares O'Neal para la evaluación de la mezcla I y Emerald para las demás mezclas). Para ello, la corriente de aire pasó a través de un Kitasato conteniendo flores frescas de arándano (100 g) recolectadas en cultivos cercanos y mantenidas en heladera hasta su uso (hasta un máximo de 72 hs).

Sólo aquellas abejas que demostraron tener una respuesta incondicionada (reflejo de extensión de probóscide ante la aplicación de solución de sacarosa de 50 % p/p sobre sus antenas) y aquellas que no respondieron al estímulo de la corriente de aire (respuesta mecánica) fueron consideradas en el análisis.

#### **4.2.1.4 Efecto del Formulado Arándano sobre el comportamiento recolector de *Apis mellifera* en cultivos de arándano**

##### **4.2.1.4.1 Estimulación olfativa de las colmenas de *Apis mellifera***

Luego de haber realizado los condicionamientos y haber elegido como el Formulado Arándano (FA) a la mezcla sintética que las abejas no pudieron discriminar del olor floral natural de arándano, se procedió a evaluar su efecto en el campo, sobre colmenas utilizadas para el servicio de polinización en cultivos de arándano. Antes de realizar la estimulación se inspeccionaron todas las colmenas de manera de utilizar solo aquellas con niveles poblacionales semejantes. Las colmenas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: i) solución azucarada 50 % p/p (Control); ii) solución azucarada 50 % p/p aromatizada con FA (Formulado) (50  $\mu$ /L); y iii) sin tratar (Testigo).

Cada tratamiento se aplicó a un total de 20 colmenas, distribuidas en cuatro grupos ubicados en los bordes de los lotes de estudio y cada colmena fue estimulada una única vez con 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 21 % de floración de ambos cultivares.

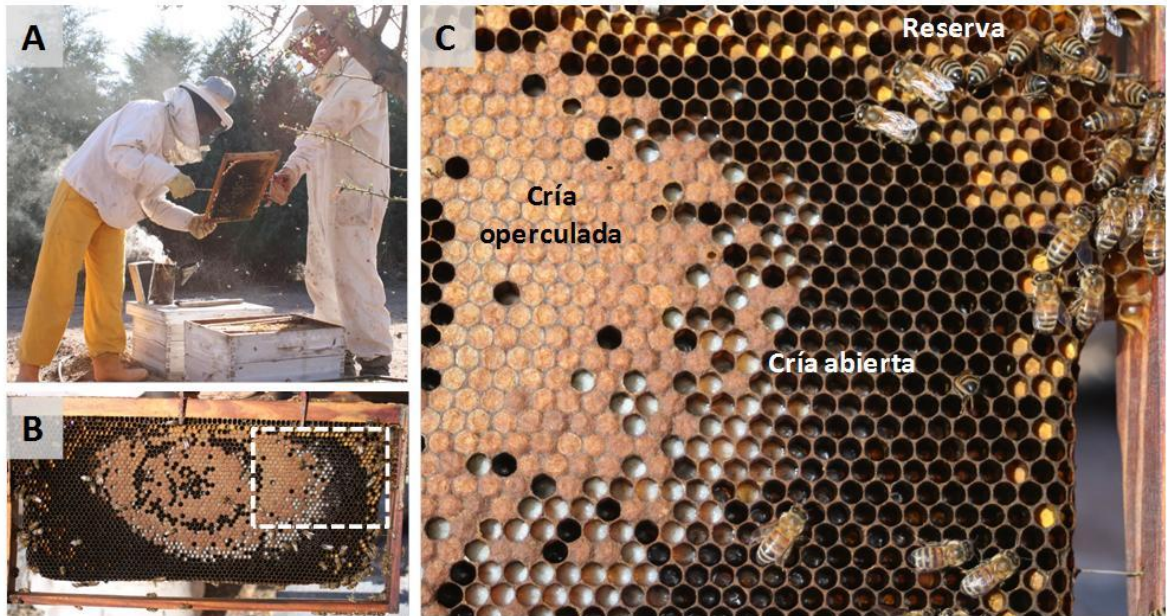
#### **4.2.1.4.2 Actividad recolectora general de las colmenas de *Apis mellifera***

Como indicador general de la actividad de las abejas en colmenas se registró el número de abejas ingresantes por minuto. Esta medición se repitió durante 5 días sucesivos (dos días pre-estimulación y tres días post-estimulación), realizando dos mediciones por día por colmena, una vez por la mañana (AM: 10 a.m. a 1 p.m.) y otra vez por la tarde (PM: 3 a 5 p.m) sobre un total de 20 colmenas por tratamiento. Las abejas que ingresaron fueron discriminadas entre abejas con carga de polen en sus patas posteriores (recolectoras de polen) o abejas sin carga de polen en sus patas posteriores (posibles recolectoras de néctar). Entre las ingresantes con carga de polen, se distinguieron aquellas portando cargas de tonalidades amarillo-amarronadas, correspondiente a polen de arándano. Su identificación fue confirmada mediante la comparación al microscopio (Labomed CXR III) de pólenes obtenidos manualmente de las anteras de las flores de arándano con el polen de las cargas de abejas que fueron capturadas mientras recolectaban de las mismas flores.

#### **4.2.1.4.3 Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de *Apis mellifera***

Con el objetivo de monitorear el desarrollo de las colmenas estudiadas, se midió el área de cría abierta y el área de reserva (miel y polen) en dos momentos: el día anterior a la aplicación de los tratamientos y 11 días más tarde (N=8 colmenas/tratamiento). Con un centímetro se estimó la superficie (alto y ancho) ocupada por celdas de cría abierta y operculada de ambas caras en todos los cuadros con cría. Se evaluó únicamente el área de cría abierta, como un indicador de la actividad de puesta de huevos de la reina post-estimulación de las colmenas (9-10 días de desarrollo desde el huevo a prepupa, momento en que es operculada la celda, Winston, 1987). Además, se estimó la superficie de reserva ocupada por celdas conteniendo miel verde, miel operculada o polen, inspeccionando ambas caras en todos los cuadros (Figura 4.3). De esta manera, se obtuvo para cada colmena un área total de cría abierta y un área total de reserva, tanto inicial como final para luego calcular la diferencia (a la que nos referiremos como delta) y así obtener su desarrollo.





**Figura 4.3 Evaluación del área de cría y de reserva de colmenas de *Apis mellifera*.** (A) Inspección de un cuadro de la colmena para el cálculo del área de cría y de reserva. (B) Cuadro de la colmena donde se ve un área central en forma de elipse con celdas operculadas de color marrón o celdas abiertas de color blanco (área de cría), rodeadas por celdas periféricas conteniendo polen amarillento o miel verde (área de reserva). El recuadro en el sector superior derecho se muestra con mayor detalle en (C). Crédito fotográfico: INSSOC.

#### 4.2.1.5 Efecto del Formulador Arándano sobre el rendimiento de cultivos de arándano

Para evaluar el efecto de la estimulación con el Formulador Arándano (FA) en el rendimiento del cultivo, se estimularon colmenas en dos sitios con distintos cultivares. En ambos casos, antes de realizar la estimulación se inspeccionaron todas las colmenas de manera de utilizar solo aquellas con niveles poblacionales semejantes. Las colmenas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: i) solución azucarada 50 % p/p (Control); y ii) solución azucarada 50 % p/p aromatizada con FA (Formulador) (50  $\mu$ /L). 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.

En el primer sitio (Concordia) cada tratamiento se aplicó a un total de 11 colmenas ubicadas en los bordes del lote de estudio y cada colmena fue estimulada una única vez con 500 ml de solución. La aplicación de los tratamientos se realizó al 40 % de floración del cultivar Emerald. Para estimar el rinde se marcaron 3 ramas de 20 plantas por tratamiento en el entorno de las colmenas tratadas. En cada rama se contabilizó el número de flores abiertas y por abrir al momento de la estimulación y el número de frutos cuajados 58 días más tarde, previo a la cosecha. Se estimó el rendimiento como la

proporción de frutos cuajados respecto del número de flores para cada rama, considerando las distintas metodologías utilizadas para este cultivo (Tuell y Isaacs, 2010; Cavigliaso *et al.*, 2020).

En el segundo sitio (Parada Robles) cada tratamiento se aplicó a un total de 10 colmenas ubicadas en los bordes del lote de estudio y cada colmena fue estimulada con 500 ml de solución en dos eventos de estimulación (con 16 días de separación). En la provincia de Buenos Aires la floración de estos cultivares suele extenderse durante al menos 6 semanas y es frecuente la ocurrencia de heladas a fines del invierno. Es por ello que se decidió realizar una segunda estimulación. La aplicación de los tratamientos se realizó al 49% de floración del cultivar Misty y al 39 % de floración del cultivar O'Neal. Para estimar el rinde se marcaron 3 ramas de 20 plantas por tratamiento (10 por cultivar) en el entorno de las colmenas tratadas. En cada rama se contabilizó el número de flores abiertas y por abrir al momento de la estimulación y el número de frutos cuajados 47 días más tarde, previo a la cosecha. Se estimó el rendimiento como la proporción de frutos cuajados respecto del número de flores para cada rama.

## **4.2.2 Desarrollo y evaluación del Formulado Kiwi**

### **4.2.2.1 Sitios de estudio, animales y olores puros**

Las colectas de volátiles se realizaron durante noviembre de 2018 en una plantación de kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, cultivar Hayward plantado junto con tres cultivares polinizadores Matua, Tomuri y Chieftain) en el establecimiento El Abrojo (38°12'54"S, 57°53'41"O), ubicado en la cercanía de la localidad de Miramar, en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Además se realizaron colectas durante la misma temporada en una plantación de kiwi (cultivar Hayward junto con Chico malo, Matua, Tomuri y Chieftain) en el establecimiento Dos Abriles, cercano a la localidad de Navarro, provincia de Buenos Aires con el fin de evaluar diferencias entre cultivares. La obtención de los cromatogramas fue realizada utilizando los equipos del Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Con el objetivo de evaluar distintas mezclas sintéticas candidatas propuestas a partir de los perfiles de volátiles se llevaron a cabo ensayos de condicionamiento olfativo absoluto durante los meses de noviembre de 2017 y de 2018, y condicionamientos diferenciales durante los meses de diciembre 2020 a febrero 2021. En todos los casos se utilizaron abejas de colmenas del apiario del Campo



Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, ubicado en Ciudad Universitaria (34°32'S, 58°26'O).

Los olores utilizados para la identificación de los compuestos volátiles y en las distintas mezclas sintéticas evaluadas para el desarrollo del Formulador Kiwi (FK) están presentes en las fragancias florales de gran cantidad de angiospermas (Knudsen *et al.*, 1993); y fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania, de Tokyo Chemical Industry (TCI), Tokio, Japón y, en el caso de la esencia comercial de jazmín de Laboratorios Helvética S.A., Buenos Aires, Argentina. Los detalles de la composición de las mezclas forman parte de una solicitud de patente aún no publicada. Por motivos inherentes al negocio potencial, en esta tesis se excluye la difusión de información detallada al respecto.

Los ensayos de campo para la evaluación del efecto de la estimulación con FK en la actividad recolectora y desarrollo de las colmenas fueron realizados durante noviembre de 2019 en una plantación de kiwi (*A. chinensis* var. *deliciosa*, cultivares Hayward, Chico malo, Matua, Tomuri y Chieftain) en el establecimiento Dos Abriles ubicado en la cercanía de la localidad de Navarro (33°47'48"S, 59°44'13"O), en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se utilizaron colmenas de abejas melíferas tipo Langstroth ubicadas en los bordes del cultivo para brindar servicios de polinización (ver Anexo A Figura A5). Cada colmena contó con 10 cuadros, una reina fecundada, entre 4 y 6 cuadros de cría, limitada reserva de alimento y alrededor de 20.000 individuos.

Los ensayos de campo para la evaluación del efecto de la estimulación con FK en el rendimiento del cultivo fueron realizados durante noviembre de 2019 en una plantación de kiwi (*A. chinensis* var. *deliciosa*, cultivares Hayward y Matua) en el establecimiento Don Carlos ubicado en la cercanía de la localidad de Mar del Plata (38°07'04"S, 57°43'51"O), en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Se utilizaron colmenas de abejas melíferas tipo Langstroth ubicadas entre las hileras del cultivo para brindar servicios de polinización en dos lotes seleccionados (ver Anexo A Figura A6). Cada colmena contó con 10 cuadros, una reina fecundada y alrededor de 20000 individuos.

#### **4.2.2.2 Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de kiwi**

Con el objetivo de corroborar los compuestos volátiles florales de kiwi reportados en bibliografía (Twidle *et al.*, 2015, 2017) y considerar posibles variaciones entre cultivares, se hicieron colectas de volátiles de los cultivares más frecuentemente utilizados en las plantaciones de kiwi de Argentina. Se

seleccionaron y embolsaron ramas de los distintos cultivares de kiwi con 4-12 flores recientemente abiertas y/o capullos. Se utilizaron bolsas de polietileno, cada una de las cuales encerraba una trampa de colecta de volátiles (ver descripción detallada en la sección 4.2.1.2). La colecta se realizó mediante la técnica de muestreo de espacio de cabeza (headspace) dinámico. Se utilizó una bomba succionadora de aire (Accura Criffer, Brasil) conectada mediante una división de vidrio en forma de tridente a tres trampas, realizando tres colectas en simultáneo (Figura 4.4). La corriente de aire fue de 2,8 L/min y la colecta duró un período de 7,5 horas (entre las 8 y 15:30 hs, coincidiendo con el período de actividad de los polinizadores).



**Figura 4.4. Dispositivo de colecta de volátiles *in vivo* de plantas de kiwi.** El dispositivo está formado por una bomba succionadora de aire conectada mediante una división de vidrio a tres trampas de colecta sujetas cada una a una rama portando flores recién abiertas. Crédito fotográfico: INSSOC.

Los volátiles adsorbidos en las trampas de colecta fueron eluidos con 2 ml de hexano (Sigma-Aldrich), y luego almacenados a -4 °C para su posterior análisis mediante CG-EM. Las trampas fueron lavadas posteriormente con 10 ml de dos solventes de diferente polaridad (metanol y hexano, en ese orden) para su reutilización.

Los análisis de CG-EM fueron realizados en un cromatógrafo de gases QP-2010 (Shimadzu Corp, Japón) equipado con una columna apolar (AT-5MS, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm, Alltech, E.E.U.U.), siguiendo el mismo método detallado en la sección 4.2.1.2. El análisis se centró en aquellos

compuestos pertenecientes a los grupos isoprenoides, y bencenoides o fenilpropanoides, y en los alquenos, ya que un gran número de dichos compuestos han sido reportados en bibliografía para varios cultivares de kiwi (Twidle *et al.*, 2017). Su identificación tentativa se basó en bibliografía ya que no se realizaron reacciones de derivatización de compuestos insaturados. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los espectros de masa obtenidos con los de las bibliotecas NIST05 y SHIM2205 del equipo, y, en algunos casos, fue confirmada comparando con los de los compuestos puros disponibles. No se identificaron los alcanos lineales o ramificados de más de 10 átomos de carbono (indicados como alcanos de cadena larga en el Anexo Figura C5).

#### **4.2.2.3 Condicionamientos olfativos absolutos**

Una vez identificados los volátiles presentes en las flores de kiwi, se propusieron distintas mezclas sintéticas con el fin de evaluar la capacidad de las abejas para generalizar cada mezcla al olor floral natural mediante un protocolo de condicionamiento olfativo absoluto (ver sección 4.2.1.3). Los olores ofrecidos como estímulos condicionados fueron seis mezclas distintas de 3 odorantes formuladas a partir de los compuestos presentes en los perfiles de volátiles de las flores de kiwi en proporciones variables (solicitud de patente en trámite).

La fase de entrenamiento constó de 5 ensayos, con un intervalo de 15 minutos entre cada uno. La fase de evaluación fue realizada 15 minutos después del último ensayo y consistió en dos presentaciones no recompensadas del olor natural de flores de kiwi (femeninas y masculinas, respectivamente). Para ello, la corriente de aire pasó a través de un Kitasato conteniendo flores frescas de kiwi (100 g) recolectadas en el cultivo y mantenidas en heladera hasta su uso (hasta 96 hs, aunque en la mayoría de los casos los ensayos se hicieron dentro de las 24 hs).

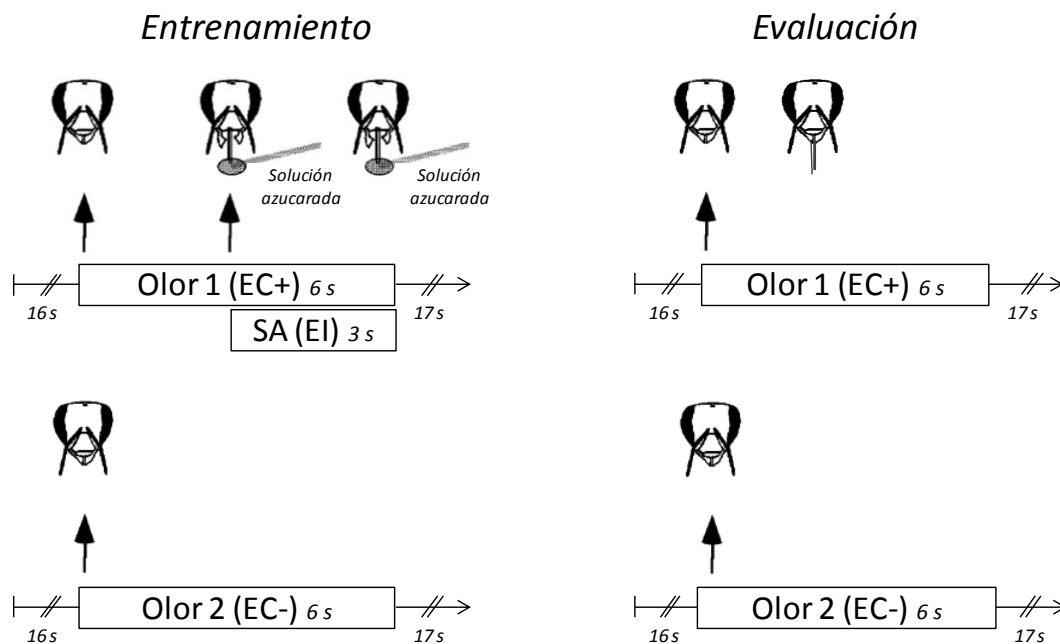
Sólo aquellas abejas que demostraron tener una respuesta incondicionada (reflejo de extensión de probóscide ante la aplicación de solución de sacarosa de 50 % p/p sobre sus antenas) y aquellas que no respondieron al estímulo de la corriente de aire (respuesta mecánica) fueron consideradas en el análisis.

#### 4.2.2.4 Condicionamientos olfativos diferenciales

En una segunda etapa, con el objetivo de evaluar la habilidad de las abejas para discriminar entre dos mezclas sintéticas y el olor natural de las flores de kiwi, se sometieron a abejas a un protocolo de condicionamiento olfativo diferencial en el cual se presentan dos olores: uno recompensado (estímulo condicionado recompensado, EC+) pareado con una solución de sacarosa 50% p/p (estímulo incondicionado, EI); y el otro no pareado con recompensa (estímulo condicionado no recompensado, EC-) (Bitterman *et al.*, 1983).

Durante la fase de entrenamiento, ambos olores (EC+ y EC-) fueron presentados cuatro veces en un orden pseudo-aleatorio (EC-, EC+, EC+, EC-, EC-, EC+, EC-, EC+). El intervalo de tiempo entre ensayos fue de 20 minutos. El mismo intervalo fue considerado entre el último ensayo y la fase de evaluación, que consistió en la presentación de los dos olores utilizados en el entrenamiento, sin recompensa (Figura 4.5). Cuando uno de los estímulos condicionados era el olor natural de un tipo de flor de kiwi (femeninas o masculinas), se incluyó como un tercer olor evaluado el otro tipo de flor de kiwi, sin recompensa.

Los olores ofrecidos como estímulos condicionados fueron la mezcla II, la mezcla V, extractos de volátiles de flores femeninas y flores masculinas de kiwi (colectados según la metodología detallada en la sección 4.2.2.2) y la esencia comercial de jazmín. Los extractos florales fueron impregnados en un papel de filtro colocado dentro de una jeringa (5  $\mu$ L), y los mismos fueron renovados cada 6 ciclos de 39 s. El uso de un extracto floral sería equivalente al uso de flores frescas en un kitasato, pero tiene la ventaja de que minimiza la liberación de compuestos volátiles asociados al daño del tejido o a la senescencia de las flores cortadas (Dobson, 1991) y permite realizar bioensayos fuera de la época de floración de la planta. Su uso fue validado previamente mediante su utilización en condicionamientos absolutos, sin encontrar diferencias en la respuesta de las abejas frente a los extractos y a las flores naturales de kiwi (resultados no presentados).



**Figura 4.5. Condicionamiento olfativo clásico diferencial en *Apis mellifera*.** En la fase de entrenamiento (panel izquierdo) se presentan en orden pseudoaleatorio: el olor 1 (estímulo condicionado recompensado, EC+) durante 6 segundos apareado a la recompensa de solución azucarada (estímulo incondicionado, EI) durante los últimos 3 segundos; o bien el olor 2 sin recompensa. En la fase de evaluación (panel derecho), se presentan ambos olores sin recompensa. En ambas fases se evalúa la respuesta de extensión de la probóscide REP durante los primeros 3 segundos. (Adaptado de Müller, 2002).

Se realizaron dos clases de condicionamientos: i) por un lado, condicionamientos en los que el EC+ fueron mezclas sintéticas (mezcla V o mezcla II), y los EC- fueron los extractos florales de kiwi o la esencia comercial de jazmín; y ii) por otro lado, la serie complementaria, que incluyó los condicionamientos en los que los EC+ fueron los extractos florales y los EC-, las mezclas sintéticas (mezcla V o mezcla II).

#### 4.2.2.5 Efecto del Formulado Kiwi sobre el comportamiento recolector de *Apis mellifera* en cultivos de kiwi

##### 4.2.2.5.1 Estimulación olfativa de las colmenas de *Apis mellifera*

Luego de haber realizado los condicionamientos y haber elegido como el Formulado Kiwi (FK) a la mezcla sintética para la cual las abejas presentaron la menor capacidad de discriminación con el olor floral natural de kiwi, se procedió a evaluar su efecto en el campo, sobre colmenas utilizadas para el

servicio de polinización en cultivos de kiwi. Antes de realizar la estimulación se inspeccionaron todas las colmenas de manera de utilizar solo aquellas con niveles poblacionales semejantes. Las colmenas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: i) solución azucarada 50 % p/p (Control); y ii) solución azucarada 50 % p/p aromatizada con FK (Formulado) (50 µ/L). Cada tratamiento se aplicó a un total de 22 y 23 colmenas, respectivamente, distribuidas en cuatro grupos ubicados en los bordes de los lotes de estudio y cada colmena fue estimulada una única vez con 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 43 % de floración del cultivar femenino y 64% de los cultivares polinizadores.

Dado que las colmenas habían ingresado al campo en dos fechas distintas (un primer grupo el 8 de noviembre, cuatro días antes de la estimulación, y un segundo grupo el 11 de noviembre, el día previo a la estimulación), esto fue considerado al momento de asignar los tratamientos y para el análisis de los datos.

#### **4.2.2.5.2 Actividad recolectora general de las colmenas de *Apis mellifera***

Como indicador general de la actividad de las abejas en colmenas se registró el número de abejas ingresantes por minuto. Esta medición se repitió en tres momentos: el día 0 previo a la estimulación y a los 2 y 8 días posteriores, realizando dos mediciones por día por colmena, una de mañana (AM: 10 a.m. a 1 p.m.) y otra de tarde (PM: 2 a 4 p.m. hs) sobre el total de colmenas estimuladas.

#### **4.2.2.5.3 Actividad recolectora de polen de colmenas de *Apis mellifera***

Para evaluar la actividad recolectora de polen se colocaron trampas de polen en la entrada de 6 colmenas de cada tratamiento de 12:30 a 16:30 hs durante tres momentos (el día 0 previo a la estimulación y a los 2 y 8 días posteriores). Se utilizaron trampas frontales convencionales (formadas por una estructura de madera con una malla metálica removible que permite el paso ajustado de las abejas, y provoca que dejen las cargas de polen antes de pasar por la malla, las cuales caen en un recipiente contenedor, Figura 4.6). Las muestras fueron almacenadas en recipientes de plástico y conservadas en un lugar seco para su posterior análisis.

En el laboratorio, las cargas de polen se discriminaron por color en dos categorías (blanco, correspondiente a kiwi, versus polen de otras especies) y contabilizaron. Su identificación fue confirmada mediante la comparación al microscopio (Labomed CXR III) de pólenes obtenidos manualmente de las anteras de las flores con el polen de las cargas de abejas que fueron capturadas mientras recolectaban de las mismas flores, y además con cargas del mismo color obtenidas de trampas de polen. Las cargas de polen color blanco fueron secadas en estufa a 60 °C durante 3-4 hs y luego pesadas.



**Figura 4.6. Trampa frontal de polen colocada en la entrada de una colmena.** Se ve en primer plano la malla metálica, la cual provoca que las abejas dejen las cargas de polen al pasar de manera ajustada para ingresar a la colmena. Las cargas de polen caen en un recipiente contenedor ubicado por debajo de la malla. Crédito fotográfico: INSSOC.

#### **4.2.2.5.4 Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de *Apis mellifera***

Con el objetivo de monitorear el desarrollo de las colmenas estudiadas, se midió el área de cría abierta y el área de reserva de polen en dos momentos: el día 0 previo a la aplicación de los tratamientos y 8 días más tarde (N=10 colmenas/tratamiento). Siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.1.4.3, se obtuvo para cada colmena un área total de cría abierta y un área total de polen, tanto inicial como final para luego calcular la diferencia (a la que nos referiremos como delta) y así obtener su desarrollo.

#### 4.2.2.6 Efecto del Formulado Kiwi sobre el rendimiento de cultivos de kiwi

Para evaluar el efecto de la estimulación con el Formulado Kiwi (FK) en el rendimiento del cultivo, se estimularon colmenas utilizadas para el servicio de polinización en otra plantación de kiwi (la cual involucraba el mismo cultivar femenino Hayward y, a diferencia de la plantación anterior, un único cultivar polinizador, Matua). Antes de realizar la estimulación se inspeccionaron todas las colmenas de manera de utilizar solo aquellas con niveles poblacionales semejantes. Las colmenas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: i) solución azucarada 50 % p/p (Control); y ii) solución azucarada 50 % p/p aromatizada con FK (Formulado) (50  $\mu$ /L). 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.

Cada tratamiento se aplicó a un total de 25 colmenas ubicadas bajo el cultivo en dos lotes y cada colmena fue estimulada una única vez con 500 ml de solución. La aplicación de los tratamientos se realizó al 94 % de floración del cultivar femenino, y al 73% de floración de los cultivares polinizadores. Para estimar el rinde se marcaron 2 ramas frente a cada colmena (N = 25 ramas frente a colmenas Control y N= 30 ramas frente a colmenas tratadas con Formulado, distribuidas en ambos lotes). En cada rama se contabilizó el número de flores abiertas y por abrir al momento de la estimulación y el número de frutos cuajados 133 días más tarde, previo a la cosecha. Se estimó el rendimiento como la proporción de frutos cuajados respecto del número de flores para cada rama considerando las distintas metodologías utilizadas para este cultivo (Howpage *et al.*, 2001; Cutting *et al.*, 2018).

#### 4.2.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa R v3.6.2 (R Core Team, 2019). Los modelos lineales generalizados (GLM) y modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) propuestos se ajustaron mediante las funciones *glm*, *glmer* y *glmmTMB* de los paquetes lme4 y glmmTMB (Bates *et al.*, 2015; Brooks *et al.*, 2017). En todos los casos se inspeccionó la distribución de los residuos, evaluando casos de sobre- o sub-dispersión, o casos de variables infladas en cero, mediante la simulación de residuos predichos utilizando el paquete DHARMa (Hartig, 2020). La significancia de los distintos factores fijos de los modelos fue evaluada partiendo del modelo máximo propuesto mediante la función *anova* para comparar entre modelos anidados (Chambers y Hastie, 1992). Los factores fijos no significativos ( $p > 0,05$ ) fueron removidos del modelo máximo (ver Anexo B Tablas B3 y B4). Las



comparaciones *a posteriori* se realizaron mediante la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth, 2020).

Se realizó un análisis por separado para cada condicionamiento absoluto a las distintas mezclas sintéticas de volátiles de arándano. En cada caso, se comparó la respuesta de extensión de probóscide al EC en el último ensayo de la fase de entrenamiento versus la respuesta al olor natural de flores de arándano en la fase de evaluación, mediante una prueba de t para muestras dependientes.

El efecto del tratamiento con FA en el número de abejas ingresantes por minuto (ingresos totales y con polen de arándano) fue analizado mediante un GLMM con estructura de error binomial negativa debido a la sobredispersión, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento (tres niveles), el tiempo post-estimulación (tres niveles), el turno (dos niveles) y el grupo de colmenas (tres niveles) como factores fijos, y la colmena como factor aleatorio. El efecto de los tratamientos en el número de abejas por minuto con polen fue analizado mediante un GLMM con estructura de error Poisson, considerando los mismos factores fijos y aleatorios.

El efecto del tratamiento con FA en el delta del área de cría abierta y de reserva fue evaluado con un GLM con estructura de error gaussiana, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento (tres niveles) y el grupo de colmenas (tres niveles) como factores fijos y el área inicial como covariable.

El efecto del tratamiento con FA en el rinde del cultivo fue evaluado con un GLMM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento (dos niveles) como factor fijo y la planta como factor aleatorio, así como también la observación ('observation-level random effects', OLRE) debido a la sobre-dispersión de los datos. En el caso del sitio Parada Robles, en el que coexistían dos cultivares, se planteó un GLMM con estructura de error binomial inflada en ceros, incluyendo el tratamiento (dos niveles) y el cultivar (dos niveles) como factores fijos, y la planta y la observación como factores aleatorios.

En el caso de los condicionamientos absolutos a las distintas mezclas sintéticas de volátiles de kiwi, se comparó la respuesta de las abejas a cada tipo de flor natural de kiwi (femeninas y masculinas) mediante un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) con estructura de error binomial Bernoulli, donde el modelo máximo incluyó el EC (seis niveles) y el tipo floral evaluado (dos niveles) como factores fijos, y la abeja como factor aleatorio. Para estimar la habilidad de las abejas de discriminar entre dos olores en los condicionamientos diferenciales, se calculó un índice de discriminación (ID)

obtenido como la diferencia entre la respuesta al EC+ menos la respuesta al EC- para cada par de ensayos ( $ID = EC+ - EC-$ ). En cada par de ensayos, se consideró que una abeja fue capaz de discriminar sólo si extendió su probóscide ante el EC+ y no ante el EC- ( $ID=1$ ). Se analizaron por separado: i) las series en donde los EC+ fueron las mezclas sintéticas de volátiles de kiwi (Mezcla II o Mezcla V) y los EC- fueron los extractos florales de kiwi o la esencia comercial de jazmín; y ii) las series en donde los EC+ fueron los extractos florales de kiwi o la esencia comercial de jazmín, y los EC- las mezclas sintéticas de volátiles de kiwi. Para analizar la dinámica durante la fase de entrenamiento, se propuso un GLMM con estructura de error binomial Bernoulli, donde el modelo máximo incluyó la serie experimental (cinco niveles) y el par de ensayos (tres niveles) como factores fijos, y la abeja como factor aleatorio.

El efecto del tratamiento con FK en el número de abejas ingresantes por minuto (ingresos totales) fue analizado mediante un GLMM con estructura de error binomial negativa debido a la sobre-dispersión, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento (dos niveles), el tiempo post-estimulación (dos niveles) y el turno (dos niveles) como factores fijos, y la colmena como factor aleatorio.

El efecto del tratamiento con FK en el peso del polen de kiwi fue evaluado con un GLMM con estructura de error gaussiana, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento (dos niveles) y la fecha (dos niveles) como factores fijos, y la colmena como factor aleatorio. El efecto del tratamiento en el número de cargas de polen de arándano fue evaluado con un GLMM con estructura de error binomial negativa debido a la sobre-dispersión de los datos, considerando los mismos factores fijos y aleatorios.

El efecto del tratamiento con FK en el delta del área de cría abierta y de polen fue evaluado con un GLM con estructura de error gaussiana, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento (dos niveles) como factor fijo y el área inicial como covariable. En el caso del área de polen, se contempló la heterocedasticidad del modelo mediante la función potencia de modelado de la varianza (*varPower*) del paquete nlme (Pinheiro *et al.*, 2019).

El efecto del tratamiento con FK en el rinde del cultivo fue evaluado con un GLM con estructura de error binomial, donde el modelo máximo incluyó el tratamiento (dos niveles) y el lote (dos niveles) como factores fijos.

## **4.3 Resultados**

### **4.3.1 Desarrollo y evaluación del Formulado Arándano**

#### **4.3.1.1 Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de arándano**

Con el objetivo de corroborar los compuestos volátiles florales de arándano reportados en bibliografía (Szendrei *et al.*, 2009; Rodríguez-Saona *et al.*, 2011) y considerar posibles variaciones entre cultivares, se hicieron colectas de volátiles de algunos de los cultivares de mayor relevancia en las plantaciones de arándano de Argentina.

Los cultivares de arándano evaluados presentaron diferencias en sus perfiles de volátiles florales (Tabla 4.1). Los compuestos mayoritarios en el perfil de flores San Joaquín fueron limoneno, decanal y alcohol de cinamilo, mientras que el compuesto mayoritario en el perfil de flores Emerald fue el hexenil acetato, seguido de limoneno, canfeno y alfa-pineno (Tabla 4.1). A modo ilustrativo, se presentan en el anexo los cromatogramas y el detalle de los 28 compuestos identificados para dos muestras de los cultivares Emerald y San Joaquín colectadas en la localidad de Gdor. Virasoro (ver Anexo C Figura C1 y Tabla C2). Se incluyen también los espectros de masa correspondientes a los compuestos mayoritarios (ver Anexo C Figuras C2 y C3). Por último, cabe mencionar que los análisis de los perfiles correspondientes a colectas realizadas en otros cultivares o bien en otras localidades, revelaron variabilidad en los compuestos identificados y en sus cantidades relativas (Tabla 4.1).

#### **4.3.1.2 Condicionamientos olfativos**

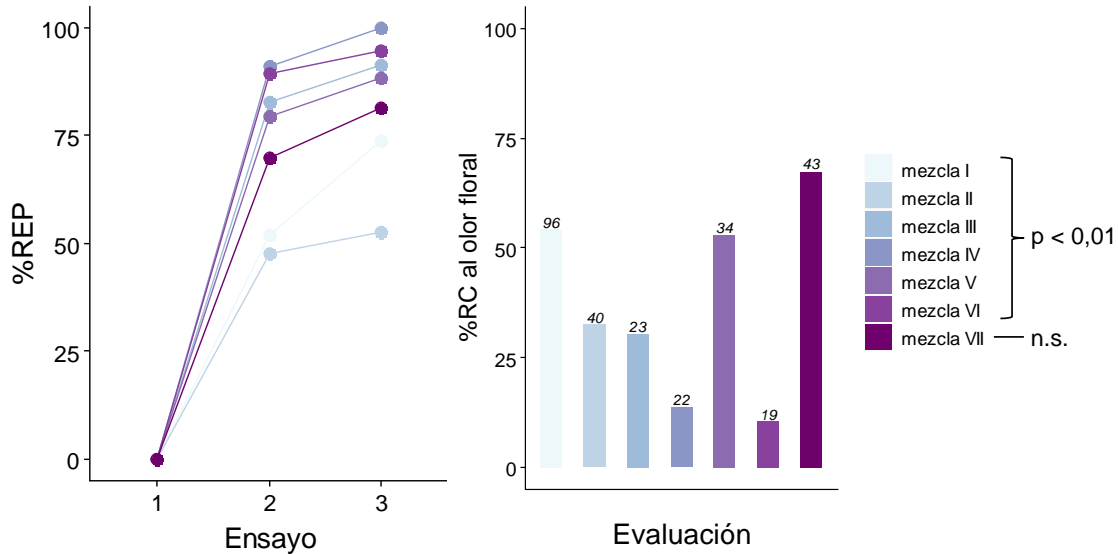
Se evaluó la respuesta de las abejas al olor natural de flores de arándano luego de haber sido condicionadas a siete mezclas sintéticas distintas formuladas a partir de los compuestos mayoritarios presentes en los perfiles de volátiles de las colectas realizadas y de los compuestos reportados en bibliografía para otros cultivares (Szendrei *et al.*, 2009; Rodríguez-Saona *et al.*, 2011).

**Tabla 4.1. Compuestos volátiles presentes en las flores de arándano *Vaccinium corymbosum*, cultivares Emerald, San Joaquín y Snowchaser, para las distintas localidades muestreadas.** (x significa presencia del compuesto, M significa que es compuesto mayoritario, \* significa que el método de colecta de volátiles fue mediante microextracción en fase sólida (fibra SPME).

Compuestos por grupo químico según Knudsen <i>et al.</i> 1993	Cultivar (Localidad)			
	Emerald	San Joaquín	Snowchaser	Emerald
	(Gdor. Virasoro)	(Gdor. Virasoro)	(Concordia)*	(San Pedro)
<i>Derivados de ácidos grasos</i>				
hexenil acetato	M	x		
nonanal	x	x		x
decanal	x	M		x
<i>Fenilpropanoides</i>				
cinamaldehído E o Z	x	x		x
alcohol de cinamilo E o Z	x	x		
hidrocinamil acetato	x	x		
<i>Isoprenoides y/o bencenoides</i>				
alfa-pineno	M	x		M
canfeno	M	x		x
benzaldehído / cumeno	x	x		M
alfa-felandreno / tujeno		M		
sabineno / beta-pineno	x	x		x
psi-cumeno				M
limoneno	M	M	x	M
copaeno / cubebano				x
burboneno	x	x	M	x
cariofileno			x	x
germacreno D			x	x

En todos los condicionamientos, se observa un aumento del porcentaje de respuesta al estímulo condicionado (EC) en los sucesivos ensayos de entrenamiento (Figura 4.7, panel izquierdo), es decir que las abejas pudieron establecer una asociación entre el olor y la recompensa. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de respuesta al olor floral natural durante la evaluación (Figura 4.7, panel derecho) y el porcentaje de respuesta al EC en el último ensayo del entrenamiento en el caso de las mezclas I a VI (prueba de t para muestras pareadas: *Mezcla I*,  $t = 2,94$ ,  $gl = 95$ ,  $p = 4,08e-03$ ,  $N = 96$ ; *Mezcla II*,  $t = 2,24$ ,  $gl = 39$ ,  $p = 0,0306$ ,  $N = 40$ ; *Mezcla III*,  $t = 5,01$ ,  $gl = 22$ ,  $p = 5,18e-05$ ,  $N = 23$ ; *Mezcla IV*,  $t = 11,53$ ,  $gl = 21$ ,  $p = 1,51e-10$ ,  $N = 22$ ; *Mezcla V*,  $t = 4,24$ ,  $gl = 33$ ,  $p = 1,68e-04$ ,  $N = 34$ ; *Mezcla VI*,  $t = 9,80$ ,  $gl = 18$ ,  $p = 1,22e-08$ ,  $N = 19$ ). En cambio, en el caso de la mezcla VII no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de respuesta en el último ensayo y en la evaluación (prueba de t para muestras pareadas; *Mezcla VII*,  $t = 1,77$ ,  $gl = 42$ ,  $p = 0,0832$ ,  $N = 43$ ). Este resultado indica que las abejas no pudieron discriminar entre

la mezcla VII y el olor natural de flores de arándano, siendo esta mezcla la elegida como el formulado que mejor representa el olor floral de arándano denominado Formulado Arándano.



**Figura 4.7. Memorias olfativas y discriminación entre siete mezclas sintéticas y el olor natural de flores de arándano.** Porcentaje de respuesta de extensión de probóscide (%REP) en un condicionamiento olfativo absoluto. Durante los tres ensayos de la fase de entrenamiento (panel izquierdo), se presentó cada una de las mezclas como estímulo condicionado recompensado. Durante la fase de evaluación (panel derecho) se presentó el olor natural de flores de arándano sin recompensa y se evaluó el porcentaje de respuesta condicionada (%RC). Se indica el número de abejas evaluadas en cada serie en el panel derecho. Las abejas no pudieron discriminar entre la mezcla VII y el olor natural de flores de arándano. El p valor corresponde a diferencias entre el porcentaje de respuesta del ensayo 3 y de la evaluación para cada mezcla (prueba de t para muestras pareadas; n.s.:  $p > 0,05$ ).

#### 4.3.1.3 Efecto del Formulado Arándano sobre el comportamiento recolector de *Apis mellifera* en cultivos de arándano

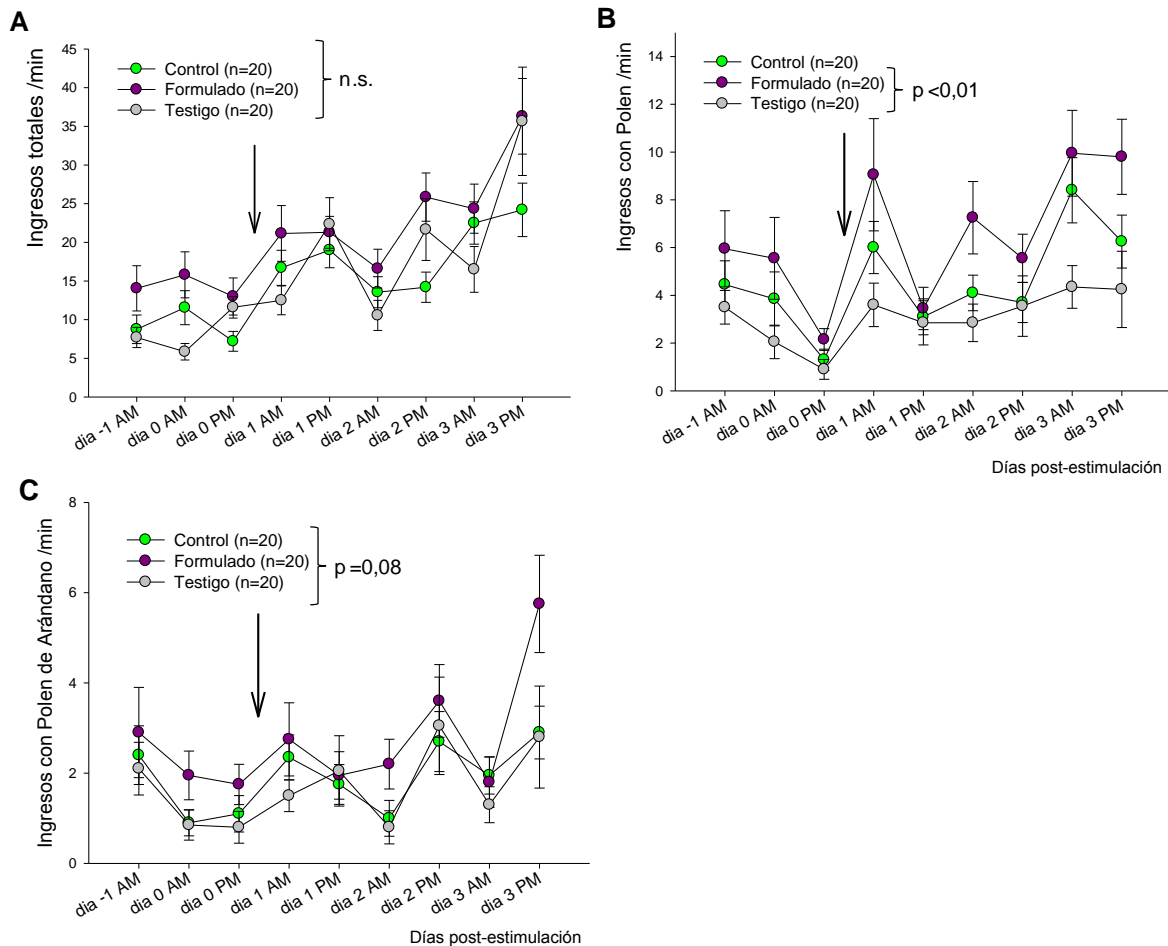
##### 4.3.1.3.1 Actividad recolectora general de las colmenas de *Apis mellifera*

Al analizar la actividad general de las colmenas a ser sometidas a los distintos tratamientos, no se encontraron diferencias significativas en el número de abejas ingresantes por minuto en los dos días previos a la estimulación para el factor *tratamiento* ni para el factor *grupo* (Figura 4.8A; GLMM, ingresos totales ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 5,41, gl = 2,  $p = 0,0669$ ; factor *grupo*: LR = 0,55, gl = 2,  $p = 0,7584$ ). Esto indica que no existían diferencias

iniciales entre los niveles de actividad de las colmenas previos a la aplicación de los tratamientos. Al analizar la actividad de los tres días post-estimulación, se observa un incremento general en el número de ingresos totales, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos (GLMM, ingresos totales ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 3,42, gl = 2, p = 0,1806; factor *día*: LR = 41,31 gl = 2, p = 1,07e-09).

En el caso de la actividad de abejas ingresantes con polen en sus patas traseras, no se encontraron diferencias en los dos días previos a la estimulación para el factor *tratamiento* ni para el factor *grupo* (Figura 4.8B; GLMM, ingresos con polen ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 4,37, gl = 2, p = 0,1127; factor *grupo*: LR = 0,96, gl = 2, p = 0,6177). Al analizar la actividad de los tres días posteriores, se encontró un efecto significativo del tratamiento (GLMM, ingresos con polen ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 8,71, gl = 2, p = 0,0129), para el factor *día* (LR = 94,02 gl = 2, p < 0,001) y para el factor *turno* (LR = 34,84, gl = 1, p < 0,001). Las colmenas tratadas con FA presentaron un nivel de actividad de recolección mayor que las colmenas Testigo (comparaciones *a posteriori*: Testigo vs FA, ratio = 0,373, se = 0,123, gl = 351, t-ratio = -2,99, p = 0,0084; Testigo vs Control, ratio = 0,516, se = 0,171, gl = 351, t-ratio = -2,00, p = 0,1135; Control vs FA, ratio = 0,724, se = 0,235, gl = 351, t-ratio = -0,997, p = 0,5790).

Por último, el análisis del número de abejas ingresantes con polen de arándano reveló que no existían diferencias iniciales en los días previos a la estimulación de las colmenas para el factor *tratamiento* ni para el factor *grupo* (Figura 4.8C; GLMM, ingresos con polen de arándano ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 2,55, gl = 2, p = 0,2789; factor *grupo*: LR = 2,69, gl = 2, p = 0,2606). El análisis de los tres días post-estimulación reveló diferencias marginales entre tratamientos, observando una tendencia positiva en las colmenas tratadas con FA (GLMM, ingresos con polen de arándano ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 5,11, gl = 2, p = 0,0777).



**Figura 4.8. Actividad recolectora de colmenas estimuladas con solución azucarada aromatizada con Formulado Arándano (Formulado), con solución azucarada sin aromatizar (Control) y sin estimular (Testigo).** (A) Actividad general, medida como el número de abejas ingresantes totales (medias  $\pm$  error estándar) en cada colmena durante 1 minuto. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el total de abejas ingresantes por minuto durante el período post-estimulación. (B) Actividad recolectora de polen, medida como el número de abejas ingresantes con carga de polen en sus patas traseras (medias  $\pm$  error estándar). Las colmenas tratadas con Formulado mostraron un mayor número de abejas ingresantes con polen por minuto que las colmenas Testigo durante el período post-estimulación. (C) Actividad recolectora de polen de arándano, medida como el número de abejas ingresantes con carga de polen de arándano en sus patas traseras (medias  $\pm$  error estándar). El número de colmenas evaluadas para cada tratamiento se indica entre paréntesis. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el número de abejas ingresantes con polen de arándano por minuto durante el período post-estimulación. La flecha negra indica el momento en el que se estimularon las colmenas. (AM, turno mañana; PM, turno tarde). El p valor corresponde a diferencias entre tratamientos durante el período post-estimulación (n.s.:  $p > 0,05$ ).

#### 4.3.1.3.2 Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de *Apis mellifera*

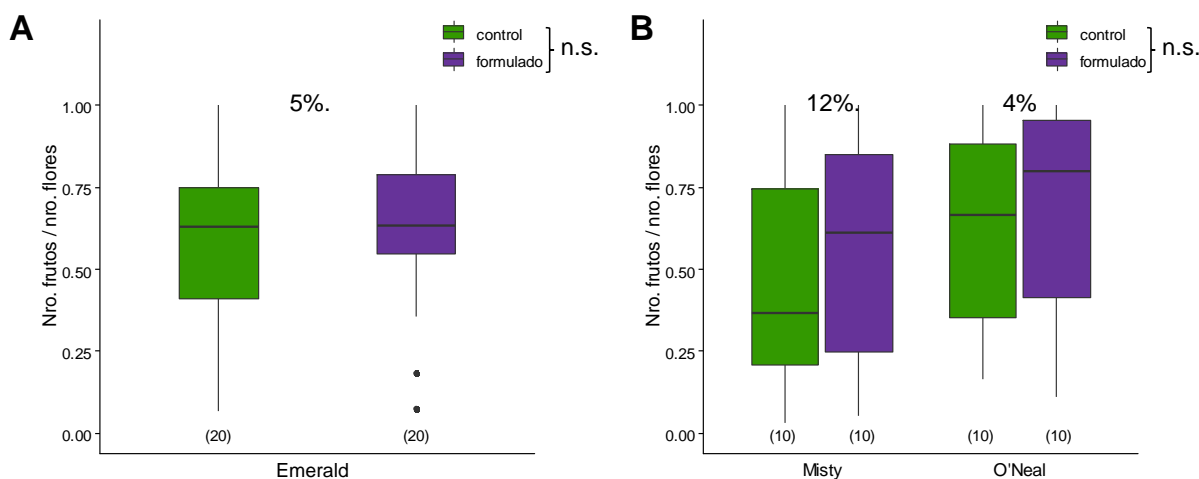
Al analizar el desarrollo del área de cría abierta a los 11 días post-estimulación, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre los grupos de colmenas (ver Anexo C Figura C4A; GLM:  $\text{delta} \sim \text{grupo} + \text{tratamiento} + \text{área inicial}$ ; factor *tratamiento*:  $F = 1,49$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,2517$ ; factor *grupo*:  $F = 1,32$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,2925$ ).

En referencia al desarrollo del área de reserva de las colmenas, si bien no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre grupos se observa un patrón de aumento de los niveles de reserva en las colmenas tratadas con FA (ver Anexo C Figura C4B; GLM:  $\text{delta} \sim \text{grupo} + \text{tratamiento} + \text{área inicial}$ ; factor *tratamiento*:  $F = 0,09$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,9107$ ; factor *grupo*:  $F = 0,704$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,5077$ ).

#### 4.3.1.4 Efecto del Formulado Arándano sobre el rendimiento de cultivos de arándano

El rendimiento del cultivo de arándano, estimado a partir de la proporción de frutos cuajados en plantas de los entornos de las colmenas de cada tratamiento, resultó similar en los dos sitios para los tres cultivares evaluados (Figura 4.9). En el sitio Concordia, cultivar Emerald, la media de frutos cuajados resultó un 5% mayor en el entorno de colmenas tratadas con FA que en el entorno de colmenas Control, aunque dicha diferencia no resultó significativa (Figura 4.9A; GLMM:  $\text{nro. frutos} / \text{nro. flores} \sim \text{tratamiento} + (1|\text{planta}) + (1|\text{ID})$ ; factor *tratamiento*:  $LR = 1,15$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,283$ ). En el sitio Parada Robles, se observa una tendencia positiva en la proporción de frutos cuajados en plantas cercanas a colmenas tratadas con FA respecto de aquellas cercanas a colmenas Control, tanto para el cultivar Misty (12%) como para el cultivar O'Neal (4%) aunque dichas diferencias no resultaron significativas (Figura 4.9B; GLMM:  $\text{nro. frutos} / \text{nro. flores} \sim \text{tratamiento} + \text{cultivar} + (1|\text{planta}) + (1|\text{ID})$ ; factor *tratamiento*:  $LR = 0,98$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,3216$ ; factor *cultivar*:  $LR = 2,70$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,1006$ ).





**Figura 4.9. Rendimiento de plantas de arándano en los entornos de colmenas estimuladas con solución azucarada aromatizada con Formulado Arándano (Formulado) y con solución azucarada sin aromatizar (Control).** (A) Número de frutos respecto del número de flores de plantas del cultivar Emerald (Concordia, prov. Entre Ríos). (B) Número de frutos respecto de número de flores de plantas de los cultivares Misty y O'Neal (Parada Robles, prov. Buenos Aires). Se observó un mayor rendimiento del cultivo (incrementos indicados en el gráfico en porcentaje para cada cultivar) en los entornos de colmenas tratadas con Formulado, aunque dichas diferencias no fueron significativas. El p valor corresponde a diferencias entre tratamientos (n.s.:  $p > 0,05$ ). Diagramas de caja donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. El número de plantas evaluadas en el entorno de cada tratamiento se indica entre paréntesis.

### 4.3.2 Desarrollo y evaluación del Formulado Kiwi

#### 4.3.2.1 Colecta e identificación de volátiles presentes en las flores de kiwi

Con el objetivo de corroborar los compuestos volátiles florales de kiwi reportados en bibliografía (Twidle *et al.*, 2015, 2017) y considerar posibles variaciones entre cultivares, se hicieron colectas de volátiles del cultivar femenino Hayward y de algunos cultivares dadores de polen.

El perfil cromatográfico del cultivar femenino Hayward (que posee flores pistiladas) resultó similar al de los cultivares polinizadores (que posee flores estaminadas) (Tabla 4.2), siendo los compuestos mayoritarios para ambos cultivares alfa-farneseno, 8-heptadeceno, heptadecadieno (identificación tentativa) y 2-feniletanol. Además, en el caso de las flores Hayward, también se observó una cantidad relativa importante de bergamoteno. A modo ilustrativo, se presentan en el anexo los cromatogramas y el detalle de los 31 compuestos identificados para dos muestras del cultivar Hayward y un cultivar polinizador colectadas en la localidad de Miramar (ver Anexo C Figura C5 y Tabla C3). Se incluyen

también los espectros de masa correspondientes a los compuestos mayoritarios (ver Anexo C Figuras C6 y C7). Por último, los análisis de los perfiles correspondientes a colectas realizadas en otros cultivares polinizadores o bien en otras localidades, revelaron similitudes en los compuestos mayoritarios aunque mostraron cierta variabilidad en los bencenoides e isoprenoides (Tabla 4.2)

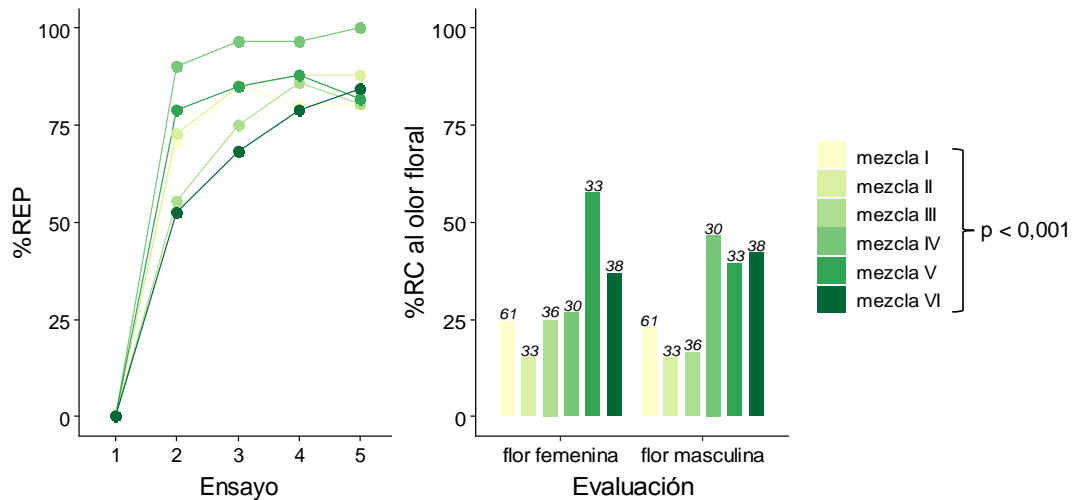
**Tabla 4.2. Compuestos volátiles presentes en flores de kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, cultivar femenino Hayward y dos cultivares polinizadores, para las distintas localidades muestreadas. (x significa presencia del compuesto, M significa que es compuesto mayoritario, tr significa trazas).**

Compuestos por grupo químico según Knudsen <i>et al.</i> 1993	Variedad (Localidad)			
	Hayward (Miramar)	Hayward (Navarro)	Polinizador 1 (Miramar)	Polinizador 2 (Navarro)
<i>Derivados de ácidos grasos</i>				
hexenil acetato	x	M	x	x
hexil acetato	tr	x	tr	x
nonanal	x	x	x	x
oxoisoforona	x	x	x	x
heptadecadieno	M	M	M	M
8-heptadeceno	M	M	M	M
<i>Bencenoides</i>				
2-feniletanol	M	x	M	M
feniletil acetato	x	tr	x	x
<i>Isoprenoides</i>				
alfa-pineno				x
sabineno				x
germacreno D	tr	tr	x	x
bergamoteno	x	x	x	x
farneseno (alfa)	M	M	M	M

#### 4.3.2.2 Condicionamientos olfativos absolutos

Se evaluó la respuesta de las abejas al olor natural de flores de kiwi femeninas y masculinas luego de haber sido condicionadas a seis mezclas sintéticas distintas formuladas a partir de los compuestos presentes en los perfiles de volátiles de las colectas realizadas y de los compuestos reportados en bibliografía para otros cultivares (Tatsuka *et al.*, 1990; Twidle *et al.*, 2017). En todos los condicionamientos absolutos, se observa un aumento del porcentaje de respuesta de extensión de probóscide (REP) al EC en los sucesivos ensayos de entrenamiento (Figura 4.10, panel izquierdo), es decir que las abejas pudieron establecer una asociación entre el olor y la recompensa. Sin embargo, los niveles de respuesta frente al olor natural de flores de kiwi disminuyen en la fase de evaluación (Figura 4.10, panel derecho). Al comparar la respuesta de las abejas entrenadas con las distintas mezclas sintéticas al olor de flores femeninas y masculinas, se encontraron diferencias significativas

entre los EC sin importar el tipo de flor evaluado (GLMM: REP ~ EC + tipo de flor evaluado + (1|abeja); factor *EC*: LR = 22,10, gl = 5, p = 5,0e-04; factor *tipo de flor*: LR = 0,07, gl = 1, p = 0,7940). Las abejas entrenadas con la mezcla V como EC presentaron los niveles de respuesta más altos frente a las fragancias florales (en especial a flores femeninas), aunque no se encontraron diferencias significativas con abejas entrenadas con las mezclas IV y VI (comparaciones *a posteriori*: I vs V: odds ratio = 0,16, se = 0,10, z-ratio = -2,85, p = 0,0498; II vs V: odds ratio = 0,07, se = 0,05, z-ratio = -3,40, p = 0,0089; III vs V: odds ratio = 0,13, se = 0,09, z-ratio = -2,86, p = 0,0481; IV vs V: odds ratio = 0,44, se = 0,30, z-ratio = -1,19, p = 0,8419; V vs VI: odds ratio = 1,86, se = 1,20, z-ratio = 0,97, p = 0,9291).



**Figura 4.10. Memorias olfativas y discriminación entre seis mezclas sintéticas y el olor natural de flores de kiwi.** Porcentaje de respuesta de extensión de probóscide (%REP) en un condicionamiento olfativo absoluto. Durante los cinco ensayos de la fase de entrenamiento (panel izquierdo), se presentó cada una de las mezclas como estímulo condicionado recompensado (EC). Durante la fase de evaluación (panel derecho) se presentó el olor natural de flores femeninas y masculinas de kiwi sin recompensa y se evaluó el porcentaje de respuesta condicionada (%RC). Las abejas pudieron discriminar entre las distintas mezclas y el olor natural de los dos tipos de flores de kiwi. Sin embargo, aquellas entrenadas con la mezcla V como EC presentaron los niveles de respuesta más altos frente a las fragancias florales. El p valor corresponde a diferencias en la respuesta al olor natural floral entre las distintas mezclas sintéticas. Se indica el número de abejas evaluadas en cada serie en el panel derecho.

#### 4.3.2.3 Condicionamientos olfativos diferenciales

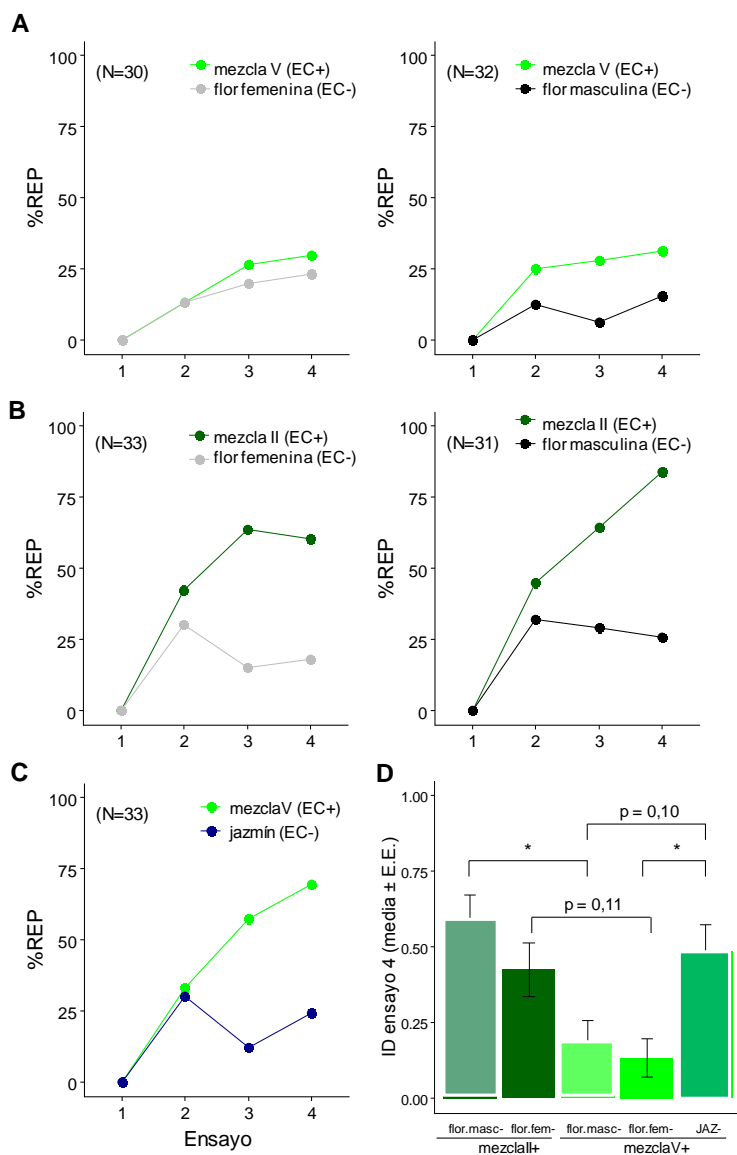
A continuación, se estudió la capacidad de las abejas de discriminación entre la mezcla V y el olor floral de kiwi mediante condicionamientos diferenciales. En una primera etapa, la mezcla V fue presentada como EC+ y los extractos naturales de flores femeninas y masculinas fueron presentados como EC- (en dos series experimentales independientes). Además, se realizaron condicionamientos

diferenciales presentando: por un lado, la mezcla II como EC+ y los extractos naturales de flores como EC- (en dos series independientes); y por otro, la mezcla V como EC+ y una esencia comercial de jazmín como EC-. Se eligió la mezcla II a modo de control, ya que ésta difería de la mezcla V tanto en los componentes como en sus proporciones, y se correspondió con niveles más bajos de respuesta de las abejas frente a las fragancias florales en el condicionamiento absoluto (ver sección anterior, Figura 4.10).

La Figura 4.11 muestra las curvas de adquisición de las series experimentales mencionadas, en las que el EC+ fueron mezclas sintéticas (mezcla V o mezcla II), y los EC- fueron los extractos florales de kiwi o la esencia comercial de jazmín. Al analizar los índices de discriminación calculados para cada par de ensayos de la fase de entrenamiento y para cada serie (definida por la combinación EC+ / EC-), se encontró un efecto significativo de la serie y del par de ensayos (GLMM: ID ~ serie + par de ensayos + (1|abeja); factor *serie*: LR = 20,89, gl = 4, p = 3,3e-04; factor *par de ensayos*: LR = 38,11, gl = 2, p < 0,001). Este resultado indica que la dinámica de adquisición del aprendizaje olfativo diferencial se vio afectada por el tipo de EC+ y EC-. En particular, el análisis del ID en el cuarto y último ensayo del condicionamiento diferencial reveló un efecto significativo de la serie (LR = 21,33 gl = 4, p = 2,7e-04; Figura 4.11D) y diferencias en el ID entre abejas entrenadas con la mezcla II y la mezcla V recompensadas frente a cada tipo de extracto floral no recompensado (comparaciones *a posteriori*: *MezclaV+FlorMasc.- vs MezclaII+FlorMasc.-*: odds ratio = 6,0, se = 3,5 z-ratio = 3,08, p = 0,0175; *MezclaV+FlorFem.- vs MezclaII+FlorFem.-*: odds ratio = 4,8, se = 3,1, z-ratio = 2,44, p = 0,1051) y diferencias entre abejas entrenadas con la mezcla V recompensada frente a cada tipo de extracto o a la esencia jazmín no recompensados (*MezclaV+FlorFem.- vs MezclaV+Jazmín-*: odds ratio = 0,16, se = 0,11, z-ratio = -2,83, p = 0,0376; *MezclaV+FlorMasc.- vs MezclaV+Jazmín-*: odds ratio = 0,25, se = 0,14, z-ratio = -2,46, p = 0,0998). Este resultado muestra que aquellas abejas entrenadas con la mezcla V recompensada presentaron una capacidad de discriminación olfativa menor que las abejas entrenadas con la mezcla II recompensada frente a los extractos florales de kiwi no recompensados. En cambio, las abejas entrenadas con la mezcla V recompensada presentaron una capacidad de discriminación olfativa mayor frente a la esencia de jazmín no recompensada.

En una segunda etapa, se evaluaron las series complementarias, en las que los extractos florales o la esencia de jazmín fueron presentados como EC+ y la mezcla II o la mezcla V fueron presentadas como EC- (ver Anexo C Figura C8). En estos casos, se encontró un efecto significativo del par de ensayos en el ID pero no de la serie (GLMM: ID ~ serie + par de ensayos + (1|abeja); factor *serie*: LR = 3,47, gl = 4, p = 0,482; factor *par de ensayos*: LR = 41,12, gl = 2, p < 0,001). Este resultado indica que

la dinámica de adquisición del aprendizaje olfativo diferencial no se vio afectada por el tipo de EC+ y EC.



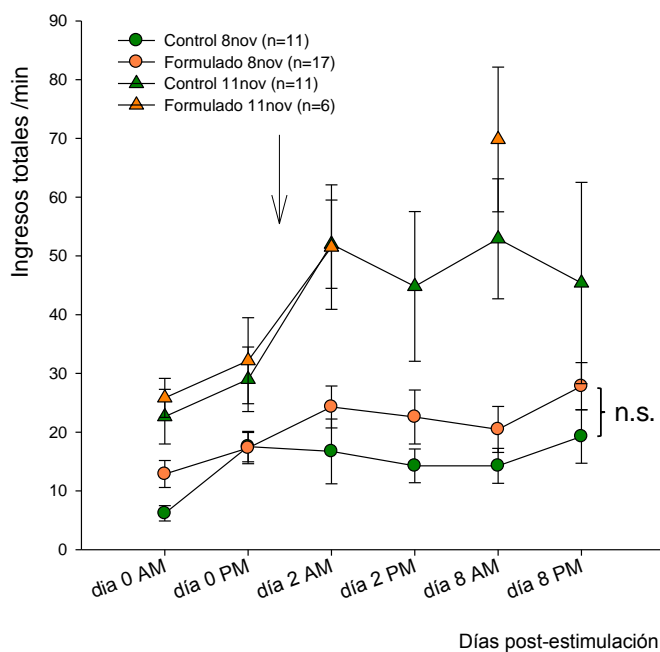
**Figura 4.11. Memorias olfativas y discriminación entre mezclas sintéticas y fragancias de flores de kiwi.** Porcentaje de respuesta de extensión de probóscide (%REP) en condicionamientos olfativos diferenciales. Durante los cuatro ensayos de la fase de entrenamiento, se presentó la mezcla V (**A**) o bien la mezcla II (**B**) como estímulo condicionado recompensado (EC+), y extractos de flores femeninas o bien masculinas como estímulo condicionado no recompensado (EC-). En (**C**) se presentó la mezcla V como EC+ y un extracto de jazmín sintético como EC-. Se indica el número de abejas evaluadas en cada serie entre paréntesis. (**D**) Índice de discriminación (ID) calculado como la diferencia entre la respuesta al EC+ menos la respuesta al EC- en el cuarto y último ensayo para cada serie (medias  $\pm$  error estándar). La capacidad de discriminación olfativa es menor en abejas entrenadas a la mezcla V recompensada y a extractos florales no recompensados. El p valor corresponde a diferencias en el ID correspondiente al ensayo 4 entre las distintas series (comparaciones *a posteriori*: \*,  $p < 0,05$ ).

Teniendo en cuenta los resultados de los condicionamientos olfativos absolutos, en los que abejas entrenadas a la mezcla V presentan niveles de respuesta más altos frente a ambos tipos de flores de kiwi, y los resultados de los condicionamientos diferenciales, que muestran que la capacidad de discriminación olfativa es menor en abejas entrenadas a la mezcla V recompensada y a extractos florales no recompensados, se elige a la mezcla V como el formulado que mejor representa el olor floral de kiwi denominado Formulado Kiwi.

### 4.3.2.4 Efecto del Formulado Kiwi sobre el comportamiento recolector de *Apis mellifera* en cultivos de kiwi

#### 4.3.2.4.1 Actividad recolectora general de las colmenas de *Apis mellifera*

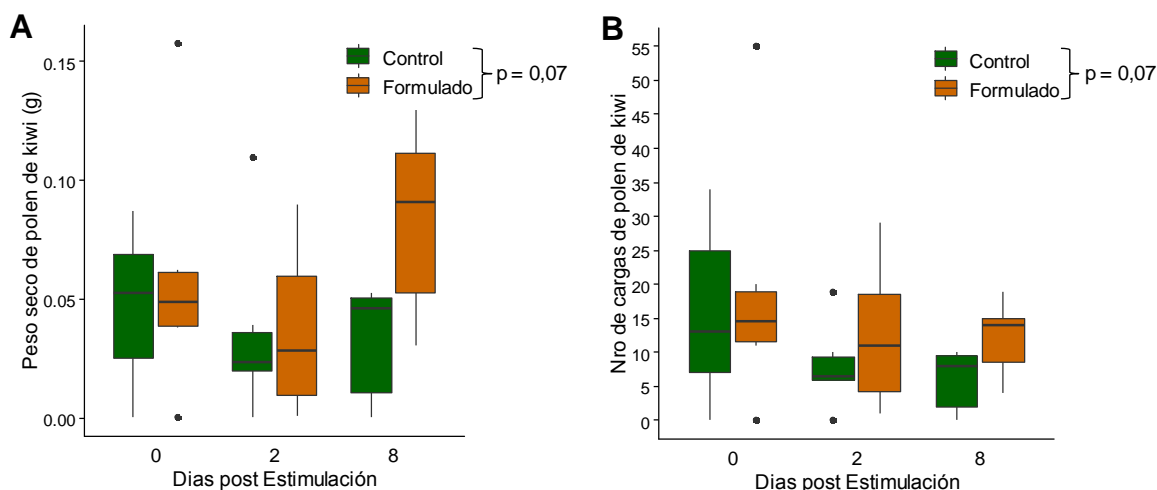
Al analizar la actividad general de las colmenas a ser tratadas con solución azucarada aromatizada con Formulado Kiwi (FK) o con solución azucarada sin aromatizar (Control), se encontraron diferencias significativas en el número de abejas ingresantes por minuto en las mediciones previas a la estimulación para el factor *ingreso* (Figura 4.12; GLMM, ingresos totales ~ día.turno + tratamiento + ingreso + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 2,34, gl = 1, p = 0,1262; factor *ingreso*: LR = 25,03, gl = 1, p <0,001). Esto indica que existían diferencias iniciales entre los niveles de actividad de las colmenas ingresadas al cultivo el 8 de noviembre y aquellas ingresadas el 11 de noviembre. Por lo tanto, los análisis de actividad post-estimulación se circunscriben al grupo de colmenas ingresadas el día 8, siendo éste el grupo que incluía el mayor número de colmenas. Se observó un incremento general en el número de abejas ingresantes a los 2 y 8 días post-estimulación, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos (GLMM, ingresos totales ~ día.turno + tratamiento + (1 | colmena); factor *tratamiento*: LR = 1,73, gl = 1, p = 0,1883; factor *día.turno*: LR = 6,76 gl = 3, p = 0,08).



**Figura 4.12. Actividad recolectora de colmenas estimuladas con solución azucarada aromatizada con Formulado Kiwi (Formulado) y con solución azucarada sin aromatizar (Control).** Actividad general, medida como el número de abejas ingresantes totales (medias  $\pm$  error estándar) en cada colmena durante 1 minuto. Un grupo de colmenas había ingresado al cultivo el día 8 noviembre (Control 8nov y Formulado 8nov) y otro grupo, tres días más tarde (Control 11nov y Formulado 11nov). El número de colmenas evaluadas para cada grupo y tratamiento se indica entre paréntesis. La flecha negra indica el momento en el que se estimularon las colmenas. La actividad fue medida de mañana (AM) y de tarde (PM) antes de estimular y a los 2 y 8 días post-estimulación. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el número de abejas ingresantes por minuto durante el período post-estimulación (n.s.: p > 0,05).

#### 4.3.2.4.2 Actividad recolectora de polen de colmenas de *Apis mellifera*

Para estudiar el efecto de la estimulación con FK en la actividad recolectora de polen, nos centramos en el peso y número de cargas de polen colectadas en las trampas correspondientes a polen de kiwi (Figura 4.13). En primera instancia, se analizaron las cargas de polen colectadas antes la estimulación de las colmenas (día 0). No se encontraron diferencias significativas en el peso seco de las mismas entre las colmenas a ser asignadas a cada tratamiento (GLM: peso seco ~ tratamiento; LR = 0,28 gl = 1 p = 0,5993). Tampoco se observaron diferencias significativas en el número de cargas de polen de kiwi colectadas antes de la estimulación de las colmenas (GLM: nro. de cargas ~ tratamiento; LR = 0,107 gl = 1 p = 0,7433).



**Figura 4.13. Actividad recolectora de polen de colmenas estimuladas con solución azucarada aromatizada con Formulado Kiwi (Formulado) y con solución azucarada sin aromatizar (Control).** Peso seco (A) y número de cargas (B) de polen de kiwi colectadas en trampas de polen, previo a la estimulación (día 0) y a los 2 y 8 días post-estimulación (N = 6 trampas /tratamiento). Diagramas de caja donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. Se observó una tendencia positiva en el peso y número de cargas de polen de kiwi a los 2 y 8 días post-estimulación. El p valor corresponde a diferencias entre tratamientos durante el período post-estimulación.

Al analizar los días post-estimulación con solución azucarada aromatizada con FK (Formulado) o con solución azucarada sin aromatizar (Control), se encontraron diferencias marginales en el peso seco de las cargas de polen de kiwi entre tratamientos y no se encontraron diferencias significativas entre los dos días evaluados (GLMM: peso seco ~ tratamiento + día + (1|colmena); factor *tratamiento*: LR = 3,19 gl = 1 p = 0,0742; factor *día*: LR = 2,31 gl = 1 p = 0,1288). Esta tendencia se reflejó también en el número de cargas de polen de kiwi colectadas dos y ocho días post-estimulación (GLMM: nro. de

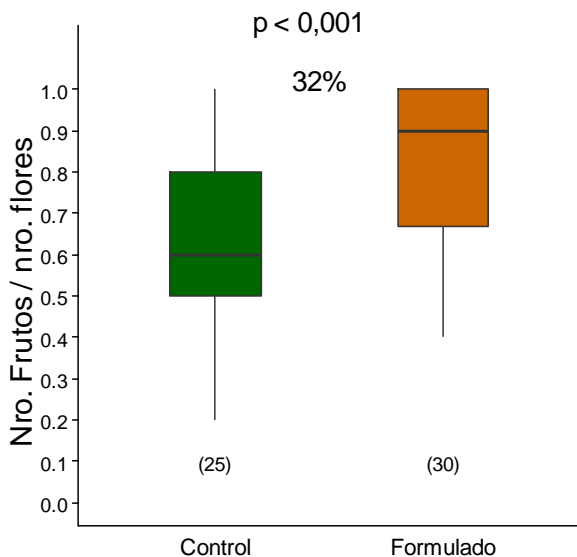
cargas ~ tratamiento + día + (1|colmena); factor *tratamiento*: LR = 3,34 gl = 1 p = 0,0676; factor *día*: LR = 0,21 gl = 1 p = 0,6474).

#### 4.3.2.4.3 Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas de *Apis mellifera*

Al analizar el desarrollo del área de cría abierta a los 8 días post-estimulación, se observó una tendencia positiva en las colmenas estimuladas con FK, aunque las diferencias no resultaron significativas entre los tratamientos (ver Anexo C Figura C9A; GLM: delta ~ tratamiento + área inicial; factor *tratamiento*: F = 2,27, gl = 1, p = 0,1504). En referencia al desarrollo del área de polen de las colmenas, tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre grupos (ver Anexo C Figura C9B; GLM: delta ~ tratamiento + área inicial; factor *tratamiento*: F = 0,09, gl = 2, p = 0,7619).

#### 4.3.2.5 Efecto del formulado Formulado Kiwi sobre el rendimiento de cultivos de kiwi

El rendimiento del cultivo de kiwi, estimado a partir de la proporción de frutos cuajados en plantas de los entornos de las colmenas de cada tratamiento, resultó significativamente mayor en las plantas cercanas a colmenas tratadas con FK que en aquellas cercanas a colmenas Control, sin encontrar diferencias entre ambos lotes (Figura 4.14; GLM: nro. frutos / nro. flores ~ tratamiento + lote; factor *tratamiento*: LR = 14,38, gl = 1, p < 0,001; factor *lote*: LR = 2,11, gl = 1, p = 0,1466). Dicho incremento fue de un 32%.



**Figura 4.14. Rendimiento de plantas de kiwi en los entornos de colmenas estimuladas con solución azucarada aromatizada con Formulado Kiwi (Formulado) y con solución azucarada sin aromatizar (Control).** Número de frutos respecto del número de flores de plantas del cultivar Hayward. Se observó un mayor rendimiento del cultivo en los entornos de colmenas tratadas con Formulado (porcentaje de incremento indicado en el gráfico). El p valor corresponde a diferencias entre tratamientos. Diagramas de caja donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. El número de plantas evaluadas en el entorno de cada tratamiento se indica entre paréntesis.



## 4.4 Discusión

En este capítulo se proponen dos formulados sintéticos específicos para los cultivos de arándano y de kiwi, desarrollados luego de determinar los volátiles florales más relevantes, que apuntan a sesgar el comportamiento recolector de las abejas melíferas hacia el cultivo de interés. El desarrollo de ambos formulados implicó un abordaje que combina aspectos de la ecología química, la cognición animal y la ecología del comportamiento, como marco teórico a partir del cual plantear la búsqueda de herramientas de manejo de colmenas utilizadas en servicios de polinización que integren los procesos cognitivos involucrados en el comportamiento recolector de las abejas melíferas.

En primer lugar, se determinaron los volátiles presentes en las flores de arándano y de kiwi con el fin de corroborar los compuestos reportados en bibliografía y considerar posibles variaciones entre distintos cultivares. En el caso del arándano, los resultados mostrados en este capítulo (Tabla 4.1) son consistentes con la variabilidad encontrada en otros cultivares (Szendrei *et al.*, 2009; Rodríguez-Saona *et al.*, 2011), pero la identidad y cantidades relativas de los compuestos mayoritarios no coincidieron con la bibliografía, lo cual denota la complejidad de las fragancias florales aún dentro de una misma especie. Los autores mencionados reportan una marcada preponderancia (>40%) del alcohol de cinamilo en los cultivares Duke, Bluecrop y Elliott. En cambio, dicho compuesto representó menos del 10% en los volátiles de Emerald y San Joaquín, aunque se identificaron otros compuestos relacionados como el cinamaldehído o el hidrocínamil acetato. Entre los compuestos más abundantes presentes en las muestras colectadas, se observó la predominancia de monoterpenos, como el limoneno, el alfa-pineno y el canfeno (presentes tanto en Emerald como en San Joaquín aunque en distintas proporciones), y de aldehídos, como el nonanal y el decanal, siendo éstos últimos reportados por Szendrei y colaboradores (2009) en las emisiones de pimpollos pero no de flores abiertas. Resulta curioso que los perfiles de las muestras de plantas Emerald tomadas en la localidad de San Pedro (prov. de Bs. As.) difirieron de aquellos de las muestras de Gdor. Virasoro (prov. de Corrientes). Si bien la metodología y tiempos de colecta fueron similares en ambos muestreos, factores como la edad de la flor, las condiciones ambientales, así como si las flores han sido polinizadas o si han sufrido daño por herbivoría, pueden alterar la emisión de volátiles (Jakobsen y Olsen, 1994; Schade *et al.*, 2001; Theis y Raguso, 2005; Szendrei *et al.*, 2009; Rodríguez-Saona *et al.*, 2011). Cabe mencionar que los picos observados en todas las corridas resultaron ser muy pequeños, por lo cual se procedió a concentrar las muestras y no fue posible realizar un análisis cuantitativo. Por otra parte, las diferencias observadas en el perfil de Snowchaser en relación a los otros cultivares, se pueden deber a la metodología utilizada, ya que en ese caso la colecta se hizo de forma estática mediante el uso de fibra

SPME, lo cual implica otro material adsorbente, y además, en el campo, la radiación excesiva puede causar que se acumule mucha humedad y temperatura dentro de la bolsa que aísla las flores junto con la fibra si los períodos de colecta son de varias horas. Además, si bien esta técnica evita el uso de un solvente de elución, las fibras son sensibles a la pérdida de volátiles si no se conservan en frío hasta su posterior análisis (Tholl *et al.*, 2006).

Respecto de los volátiles florales de kiwi, los compuestos identificados coincidieron con la bibliografía (Twidle *et al.*, 2015, 2017), observando una preponderancia de hidrocarburos de cadena larga (específicamente, alquenos) y de sesquiterpenos (Tabla 4.2). Los perfiles del cultivar femenino Hayward y los cultivares polinizadores considerados resultaron similares entre sí cualitativamente, aunque se encontraron diferencias en las cantidades relativas de ciertos compuestos, en particular de terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos). Estudios previos centrados en dicha clase de compuestos revelaron que las flores femeninas emiten 1,3 veces más terpenoides que las masculinas (Nieuwenhuizen *et al.*, 2009). Al igual que para las muestras de arándano, las colectas de un mismo cultivar realizadas en distintas localidades presentaron algunas diferencias cualitativas además de cuantitativas. En el caso del cultivar Hayward, sólo fue posible analizar una única muestra de la localidad de Navarro (prov. de Bs. As.) y ésta resultó bastante disímil a los perfiles de aquellas colectadas en Miramar (prov. de Bs. As.), por lo que sería necesario tomar nuevas muestras estandarizando ciertos parámetros (edad de la flor, estado de polinización, etc.) para poder concluir respecto de la variabilidad entre ambas localidades.

Aunque las fragancias florales están conformadas por más de cien componentes, las abejas recolectoras utilizan unos pocos compuestos, denominados “olores clave”, para reconocer cada olor floral (Blight *et al.*, 1997; Laloi *et al.*, 2000; Riffell *et al.*, 2009; Reinhard *et al.*, 2010). Dada la gran variabilidad observada entre los cultivares tanto de arándano como de kiwi, el desarrollo de los formulados específicos implicó la puesta a prueba de un número considerable de mezclas sintéticas candidatas, formuladas a partir de los compuestos mayoritarios identificados en las muestras colectadas y en la bibliografía. Tal variabilidad entre distintos genotipos ha sido documentada en otras especies cultivadas y la capacidad de abejas de discriminar o generalizar entre ellos depende de cada caso particular (Pham-Delegue *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 2002). En el caso del formulado desarrollado para arándano, las mezclas evaluadas estaban conformadas por tres o cuatro componentes, y si bien las abejas mostraron niveles altos de respuesta condicionada en el último ensayo del entrenamiento para todas las mezclas, su respuesta frente al olor floral natural fue variable, superando el 50% sólo para tres mezclas (Figura 4.7). La mezcla elegida como Formulado Arándano fue aquella para la cual la respuesta condicionada no difirió significativamente de la respuesta frente al olor de flores de

arándano (Emerald), infiriendo que las abejas percibieron como equivalentes ambos estímulos, es decir que no pudieron discriminar entre la mezcla sintética y el olor floral natural.

En el caso del kiwi, en el que los volátiles emitidos por flores femeninas y masculinas difieren, el desarrollo de un formulado sintético resultó más complejo, ya que se propuso la búsqueda de una única mezcla que pueda ser generalizada con el olor natural de ambos tipos florales. Las seis mezclas candidatas presentaron curvas de adquisición similares, con más de un 80% de abejas respondiendo a las mezclas en el último ensayo de entrenamiento (Figura 4.10). Sin embargo, en la evaluación, los niveles de respuesta frente al olor natural de cada tipo de flor resultaron significativamente menores, por debajo del 50% para casi todas las mezclas. En particular, abejas condicionadas con las mezclas IV, V y VI presentaron niveles similares de respuesta frente al olor de flores masculinas, lo cual puede explicarse por el hecho de que estaban conformadas por los mismos componentes en distintas proporciones. Dado que los resultados de los condicionamientos absolutos no fueron concluyentes, se procedió a evaluar la capacidad de discriminación de las abejas mediante condicionamientos diferenciales, en los que se presentaron dos mezclas sintéticas como EC+ y los extractos florales naturales como EC-. Para ello, se eligieron como EC+ a la mezcla V, la cual sería una buena candidata correspondiendo al mayor nivel de respuesta observado en el condicionamiento absoluto, o bien a la mezcla II, la cual sería una mala candidata correspondiendo al nivel de respuesta más bajo; y por otro lado, como EC- a los extractos florales de kiwi y a la esencia comercial de jazmín, como control. En un condicionamiento diferencial típico, si las abejas son capaces de discriminar entre los dos olores presentados, se obtienen dos curvas de aprendizaje bien separadas, con niveles incrementales de respuesta para el EC+ y niveles basales de respuesta para el EC- para los sucesivos ensayos de entrenamiento. Este tipo de dinámica pudo observarse en la Figura 4.11B y 4.11C para la mezcla II (EC+) y el olor floral de kiwi (EC-), y para la mezcla V (EC+) y el jazmín (EC-), respectivamente. En cambio, en la Figura 4.11A se observó un perfil muy diferente para la mezcla V (EC+) y el olor floral natural (EC-), en donde los niveles de respuesta de las abejas frente al olor recompensado se mantuvieron más bajos, y cercanos a los niveles de respuesta al olor no recompensado, correspondiéndose con valores menores para el índice de discriminación calculado para el último ensayo (Figura 4.11D). Esto sugiere que las abejas no pudieron discriminar claramente entre ambos estímulos, lo cual dificultó el establecimiento de una asociación olor-recompensa. Cabe mencionar que las abejas presentaron una asimetría en su capacidad de discriminación entre la mezcla sintética V y el olor floral natural (Anexo C Figura C8). Cuando este último fue presentado como EC+ y la mezcla V como EC-, las abejas mostraron niveles más bajos de respuesta al EC- y más altos para el EC+ (en particular para el extracto de flores femeninas) en el último ensayo del entrenamiento. Este tipo de asimetría podría deberse a una diferencia de concentraciones entre la

mezcla sintética y el extracto floral, ya que al estar la primera conformada por olores puros, éstos alcanzan concentraciones más elevadas. Estudios previos muestran que las abejas extraen información acerca de la concentración de un olor, la cual sería utilizada como otra dimensión en el reconocimiento de los olores (Wright *et al.*, 2005). Por otra parte, Pelz y colaboradores (1997) observaron mayores niveles de respuesta para la presentación de olores puros en alta concentración, aún cuando éstos no eran recompensados, sugiriendo que las abejas podrían establecer asociaciones más fuertes para altas concentraciones que para bajas concentraciones. Sin embargo, la respuesta a la mezcla V (alta concentración) se redujo cuando el extracto de flores femeninas de kiwi fue presentado como EC+. De todas maneras, en las series experimentales en las que se presentó la mezcla II versus los extractos florales o bien la mezcla V versus la esencia comercial de jazmín, los niveles de respuesta al EC+ fueron siempre más altos que aquellos al EC-, sugiriendo que en esos casos los estímulos eran más fácilmente discriminables que cuando se presentó la mezcla V versus los extractos florales. Teniendo en cuenta estos resultados, se definió a la mezcla V como Formulado Kiwi, siendo la mezcla sintética que mejor representa el olor floral natural.

Como parte de los ensayos de campo, se planteó estudiar el efecto de la estimulación olfativa sobre la actividad de colmenas utilizadas en servicios de polinización y sobre el rinde del cultivo, ya que un sesgo en la actividad recolectora de las abejas en el cultivo de interés se traduciría en una mayor polinización y producción de frutos. Para ello, se alimentaron colmenas con solución azucarada aromatizada con cada Formulado Específico, de manera que las abejas pudieran establecer en el nido memorias olfativas específicas del cultivo que guiaran la búsqueda de recursos al poco tiempo de haber sido ingresadas en el campo, utilizando una metodología similar a la de otros trabajos previos del grupo de investigación (Arenas *et al.*, 2008; Farina *et al.*, 2020).

Durante los primeros días post-estimulación, tanto en los cultivos de arándano como de kiwi, la actividad general de colmenas alimentadas con solución azucarada aromatizada con el Formulado Específico tendió a ser mayor que la de colmenas sin tratar, aunque dicha tendencia no resultó significativa (Figuras 4.8 y 4.12). En el caso del cultivo de arándano, se encontró una diferencia significativa en el número de ingresantes con polen entre las colmenas tratadas y las testigo durante los primeros tres días post-estimulación, aunque dicha diferencia fue marginal al considerar el polen de arándano. Cabe mencionar que el número de ingresantes con polen de arándano pudo haber sido subestimado, ya que las cargas corbiculares pueden ser difíciles de distinguir en la entrada de las colmenas por su coloración y su pequeño tamaño, dado que las abejas no son capaces de vibrar las anteras de las flores de arándano y recolectan cantidades limitadas de polen. En el caso del cultivo de kiwi, la actividad semejante entre ambos tratamientos podría deberse en parte a que la entrada de un

grupo de colmenas se vio demorada a causa del mal tiempo y la aplicación del tratamiento ocurrió cuatro días después del ingreso de la mayoría de las colmenas, con un nivel de floración muy alto, es decir, que las abejas ya contaban con información del entorno y con disponibilidad de un gran número de flores de kiwi al momento de ser estimuladas.

Por otra parte, dado que las flores de kiwi no ofrecen néctar, resulta relevante cuantificar la actividad recolectora de polen de las colmenas, para lo cual se utilizaron trampas de polen. Al evaluar tanto el peso como el número de las cargas de polen de kiwi, se observó una tendencia positiva en las colmenas tratadas con Formulado (Figura 4.13). Si bien el número de trampas fue acotado, resulta promisorio el incremento observado en el peso seco del polen de kiwi observado a los 8 días post-estimulación. Estudios adicionales distinguiendo el tipo de polen recolectado así como el seguimiento de las abejas en el cultivo, permitirían concluir si la actividad de las abejas presenta un sesgo hacia uno de los dos tipos florales de kiwi. Algunos trabajos mencionan que las cargas de polen de flores masculinas son de color blanco mientras que las de flores femeninas son de tonalidades blanco-amarillentas, y reportan un incremento del número de cargas mixtas con el avance de la floración (Jay y Jay, 1984). Los resultados aquí presentados como polen de kiwi corresponden a cargas corbiculares de color blanco, pero se ha visto en otros años que algunas cargas corbiculares pueden presentar dos colores (mixtas). Aunque el polen de flores femeninas (pseudopolen) no es viable y usualmente no posee protoplasma (Schmid, 1978; Ferguson, 1984), las abejas lo recolectan activamente y así los estambres de las flores femeninas cumplirían una función de atracción de polinizadores como ha sido demostrado en otras especies del género *Actinidia* que tampoco ofrecen néctar como recompensa (Kawagoe y Suzuki, 2004). Más aún, se ha reportado que las abejas melíferas visitan mayoritariamente las flores femeninas que las masculinas, en algunos casos sin cruzarse entre cultivares en las sucesivas visitas, lo cual podría deberse a pequeñas diferencias en su morfología, su fragancia y la coloración del polen (Palmer-Jones y Clinch, 1974; Jay y Jay, 1984; Goodwin y Steven, 1993).

Por último, se estimó el efecto del tratamiento en el rinde los cultivos a partir del número de frutos cuajados en plantas de cercanías a cada grupo de colmenas. En el cultivo de arándano, se evaluó el rinde en tres cultivares, Emerald, O'Neal y Misty, para las cuales se observaron incrementos del 5%, 4% y 12%, respectivamente (Figura 4.9). Si bien las diferencias entre los tratamientos no resultaron significativas, tal tendencia positiva en el rendimiento de tres cultivares distintos resulta relevante para la industria de producción de fruta fina. Asimismo, cabe mencionar que aunque el desarrollo del Formulado Arándano se basó principalmente en los volátiles florales del cultivar Emerald, se vieron resultados promisorios en el rinde de otras variedades, lo cual sugiere que a pesar de la variabilidad

entre genotipos es posible formular una mezcla simplificada representativa del olor floral de arándano. Por otra parte, es importante considerar la complejidad del sistema para el cual, en nuestras latitudes, los períodos de floración y fructificación se extienden durante varias semanas (de agosto a noviembre), siendo frecuente la ocurrencia de heladas y granizo que pueden limitar la actividad de las abejas o bien dañar los frutos. En el caso del cultivo de kiwi, el rinde se midió en una única localidad, obteniéndose un incremento significativo del 32% en el número de frutos cuajados (Figura 4.14), lo cual invita a evaluar el efecto del tratamiento en plantaciones con otros cultivares polinizadores y/o diferentes esquemas de distribución de los cultivares para corroborar la acción del Formulado Kiwi. En este cultivo, en el cual la floración es explosiva y acotada en el tiempo, el efecto del Formulado Kiwi podría ser crucial en los primeros días desde el ingreso de las colmenas, acortando los tiempos de familiarización de las abejas en el nuevo entorno, y disminuyendo la probabilidad de que visiten flora competitiva de los alrededores. Por otra parte, el efecto del tratamiento podría verse sólo en los primeros días, dado que la estimulación olfativa se da asociada a una recompensa (solución azucarada) que luego no es replicada en el entorno natural ya que las flores no ofrecen néctar. Estudios futuros con un mayor seguimiento de las colmenas desde su ingreso al cultivo y utilizando como recompensa el polen de las flores de kiwi ayudarían a una mejor comprensión de las preferencias de las abejas en este sistema.

Por otra parte, dada la particularidad de estos dos cultivos en los que suelen coexistir una variedad de cultivares en las plantaciones, y luego de no haber obtenido resultados concluyentes para todas las variables consideradas en las evaluaciones a campo de los formulados seleccionados, surge la pregunta de cuán disímiles podrían ser los perfiles volátiles de los cultivares más utilizados comercialmente. Si bien el estudio comparativo cuantitativo de la composición de los volátiles florales no fue planteado como un objetivo de la presente Tesis, a partir de los resultados obtenidos se propone una aproximación a un análisis de este tipo para las variedades con las que se contaba con al menos cuatro muestras colectadas en condiciones estandarizadas (ver Anexo D). Resulta interesante que en el caso del arándano, los cultivares Emerald y San Joaquín se diferenciaron significativamente en los perfiles de volátiles florales (ver Anexo C Figura C10; análisis de varianza multivariante permutacional [PERMANOVA], factor *cultivar*:  $F = 6,004$   $p = 0,006$ ). Este primer análisis, aunque está limitado a un bajo número de muestras y no pudo realizarse para los cultivares de los campos en donde se estimularon colmenas, sugiere que el Formulado Arándano podría representar mejor el olor natural de ciertos cultivares y ser menos generalizable a otros. En el caso del kiwi, el análisis multidimensional muestra que los perfiles del cultivar femenino Hayward y de algunos cultivares masculinos polinizadores no se diferencian significativamente (ver Anexo C Figura C11; PERMANOVA, factor *tipo floral*:  $F = 1,3755$   $p = 0,283$ ). Esto concuerda con la coincidencia de los

compuestos mayoritarios en las distintas variedades. Sin embargo, pequeñas variaciones en la composición de los aromas florales pueden ser discriminadas por las abejas como queda evidenciado por los resultados de los condicionamientos olfativos (Figura 4.10) en donde el porcentaje de respuesta frente a flores femeninas y masculinas no es uniforme para las mezclas III a VI, cuyas formulaciones implican los mismos compuestos en distintas proporciones. Considerando los resultados de la estimulación de colmenas con los Formulados Específicos, se puede inferir una relación positiva entre variables referidas a la actividad de las abejas (recolección de polen) y al rinde del cultivo (porcentaje de frutos cuajados), y una mayor similitud entre la composición de los volátiles florales entre cultivares, aunque no se analizaron los perfiles de todos los genotipos presentes en los distintos campos. Mientras que en el caso del arándano, una mayor heterogeneidad entre las fragancias florales de los cultivares se correspondió con resultados menos concluyentes tanto en la actividad de las abejas como en el rendimiento del cultivo, lo cual podría confirmarse evaluando un mayor número de cultivares. El estudio de la composición de las fragancias florales de los distintos cultivares y de cómo son percibidos por las abejas permitirían una mejor comprensión de su comportamiento como polinizadores del cultivo, pudiendo aportar valiosa información por ejemplo para la selección genética de caracteres asociados con los perfiles de volátiles de cultivares que suelen ser plantados de forma conjunta, de manera de favorecer la atracción de las abejas melíferas hacia dichas variedades y favorecer la polinización cruzada.

En conclusión, los resultados presentados en este capítulo son alentadores y se suman a otros previamente documentados para los Formulados Específicos desarrollados para cultivos tan diversos como girasol, peral o manzano (Díaz, 2013; Susic Martin, 2015). Esta tecnología y el protocolo propuesto poseen además como ventaja que son de fácil aplicación, son prácticas amigables con el ambiente ya que no utilizan insumos contaminantes y, por otra parte, al optimizar la actividad recolectora de las abejas melíferas, permitirían reducir el número de colmenas requeridas en cultivos que tradicionalmente contratan altas densidades de colmenas trashumantes o bien recurren a prácticas como la polinización artificial.

## Discusión general

A lo largo de esta Tesis, se estudió el comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* y de otros polinizadores nativos, tanto silvestres como manejados, en tres cultivos dependientes de polinización entomófila. La creciente demanda de servicios de polinización y la disminución de las poblaciones de los polinizadores a nivel global han suscitado la preocupación de diversos sectores (científicos, productivos, gubernamentales), lo cual ha impulsado el manejo de especies alternativas de polinizadores así como el desarrollo de herramientas que mejoren el desempeño de las especies ya utilizadas para tal fin (Mader *et al.*, 2010; IPBES, 2016; Roubik, 2018a). Si bien las abejas melíferas son el principal polinizador utilizado en sistemas agrícolas (McGregor, 1976; Delaplane y Mayer, 2000; Klein *et al.*, 2007), su eficiencia se ve disminuida en ciertos cultivos específicos que presentan un marcado dimorfismo sexual, o una morfología floral restrictiva, o bien no ofrecen néctar como recompensa, como es el caso de los tres cultivos estudiados en la presente Tesis.

En primer lugar, se evaluó la recolección de recursos y la constancia floral de las abejas melíferas y de las abejas silvestres nativas *Melissodes* spp. en un cultivo altamente dimórfico de girasol para la producción de semillas híbridas (Capítulo 2). En dicho sistema, la contribución de abejas nativas oligolécticas a la polinización podría ser menor a la esperada dada su marcada preferencia por inflorescencias MF y su alta constancia floral. Si bien el rol de los polinizadores silvestres en agroecosistemas ha sido reconocido en los últimos años (Garibaldi *et al.*, 2013; Rader *et al.*, 2016, 2020), la contribución relativa de las distintas especies varía en función de la diversidad de los ensambles de polinizadores la cual puede modificarse en el espacio y el tiempo (Rader *et al.*, 2012; Gibbs *et al.*, 2016). Más aún, los ensambles de polinizadores silvestres suelen ser menos diversos en regiones por fuera del área de distribución nativa de las plantas cultivadas, especialmente en áreas de gran intensificación agrícola, en donde los hábitats semi-naturales que ofrecen recursos alimenticios y sitios de nidificación se encuentran reducidos a pequeñas superficies fragmentadas. En tales paisajes, si bien los cultivos ofrecen abundantes recursos, la oferta se da de forma explosiva durante un período limitado, y los polinizadores dependen de la disponibilidad de otras fuentes de alimento y de sitios de nidificación cercanos para su supervivencia (Mandelik *et al.*, 2012). Por otra parte, en un cultivo



oleaginoso de floración masiva se ha encontrado que aunque la abundancia de polinizadores resultaba un indicador predictivo del rinde, la diversidad funcional entre las especies era relevante para explicar parte de la variabilidad observada (Woodcock *et al.*, 2019). Estos resultados apoyan la hipótesis de complementariedad, dado que el no solapamiento de rasgos morfológicos y comportamentales de los polinizadores facilitaría la provisión de servicios de polinización de manera más estable en condiciones ambientales variables (Woodcock *et al.*, 2019). Numerosos estudios muestran que distintos grupos de abejas se diferencian en rasgos tales como el tamaño corporal, la pilosidad, el largo de la probóscide, la recompensa floral recolectada o el tiempo invertido por visita, lo cual influye en su eficiencia de polinización (Hoehn *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2015). Así, ensamblajes diversos de polinizadores pueden propiciar interacciones interespecíficas que promuevan de manera indirecta la polinización del cultivo (Greenleaf y Kremen, 2006; Carvalheiro *et al.*, 2011). Sin embargo, en regiones con uso agrícola intensivo que suelen además presentar una disminución de la biodiversidad como consecuencia de la reducción de áreas con vegetación espontánea (bordes de cultivo, banquinas y superficies circundantes sin cultivar), el elenco de polinizadores silvestres puede limitarse a tan solo unas pocas especies numéricamente inferiores frente a las abejas melíferas introducidas al cultivo. En dichos escenarios, la abundancia de unas pocas especies dominantes, y no la riqueza de especies, resulta determinante en la provisión del servicio de polinización (Winfrey *et al.*, 2015). En la plantación de girasol estudiada en la presente Tesis, en la cual la densidad de abejas *Melissodes* fue marcadamente inferior a la de las abejas introducidas, ambos grupos visitaron preferentemente distintas líneas parentales de girasol con una alta constancia floral, lo cual disminuyó la probabilidad de las interacciones que faciliten la transferencia de polen entre parentales. Estudios previos en plantaciones de girasol de la región Pampeana han reportado gran variación geográfica en la composición de los ensamblajes de polinizadores, siendo *A. mellifera* responsable de más del 90% de las visitas relevadas (Torreta *et al.*, 2010; Sáez *et al.*, 2012), aunque se ha documentado una mayor preponderancia de abejas del morfotipo *Melissodes* (incluyendo *Melissodes tintinnans* y *M. rufithorax* y dos especies del género *Melissoptila*) en otros sitios de esta región (Chamer *et al.*, 2020). En tal contexto, resulta necesario evaluar la identidad y los niveles de las poblaciones polinizadores silvestres presentes en cada sistema agrícola e implementar estrategias de manejo a escala local que promuevan poblaciones de abejas silvestres más abundantes y más diversas que contribuyan a la productividad del cultivo de girasol (Garibaldi *et al.*, 2014; Chamer *et al.*, 2020; Monasterolo *et al.*, 2020).

En segundo lugar, se estudió el comportamiento de *A. mellifera* y del abejorro *B. pauloensis*, ambas especies introducidas en una plantación mixta de arándano para brindar servicios de polinización (Capítulo 3). El manejo comercial de abejas para brindar servicios de polinización se ha ampliado en

las últimas décadas a varias especies de abejorros (*Bombus* spp.), algunas abejas sin aguijón (Meliponini) y unas pocas especies de abejas solitarias en todo el mundo, con especial atención a las especies nativas (IPBES, 2016; Roubik, 2018b; Osterman *et al.*, 2021). Entre estas últimas especies, el uso de los abejorros *B. pauloensis* en servicios de polinización en Sudamérica se ha expandido en las últimas décadas desde su primera mención en 2007 y actualmente se comercializan colonias de esta especie nativa en todos los países del continente (Osterman *et al.*, 2021). En Argentina, se han documentado efectos positivos del uso de abejorros junto con abejas melíferas en la polinización de cultivos de frutillas, arándanos y manzanos (Carlazara *et al.*, 2013; Díaz, S.A. *et al.*, 2013a,b; Pérez-Méndez *et al.*, 2020), aunque son escasos los estudios del comportamiento de ambos polinizadores en plantaciones con distintas variedades de los cultivos. Respecto a este punto, la presente Tesis muestra que el comportamiento de ambas especies se ve influenciado por la identidad del cultivar de arándano, siendo variable la morfología floral y el volumen de néctar ofrecido por cada genotipo. Por otra parte, si bien *A. mellifera* y *B. pauloensis* se diferenciaron a nivel individual en el número de flores de arándano visitadas y los recursos recolectados, no se observaron interacciones agresivas entre ambas especies aún con una densidad de abejas de 20 colmenas por hectárea en el segundo año de muestreo, superando el número recomendado o generalmente usado por productores en otras regiones (Delaplane y Mayer, 2000; Isaacs y Kirk, 2010). El despliegue de un alto número de colmenas por hectárea es frecuente en cultivos como el arándano, para los que es común que los productores supongan que al aumentar la cantidad de colmenas aumenten las visitas de las abejas al cultivo y en consecuencia el rinde del cultivo; sin embargo, la relación entre frecuencia de visitas y el rinde puede ser no-lineal en muchos cultivos (Rollin y Garibaldi, 2019). Más aún, dado que el aumento del número de colmenas no resultó en mayores densidades de abejas melíferas visitando las flores de arándano, los resultados presentados en esta Tesis aportan evidencia a favor de una estrategia de manejo de más de una especie de polinizadores que se complementen en su comportamiento por presentar rasgos funcionales diversos, tales como tamaño y pilosidad corporal, largo de la probóscide, capacidad de vibrar las anteras, o constancia floral. La complementación de colmenas de abejas melíferas con otros polinizadores comerciales o silvestres ha resultado beneficiosa para el servicio de polinización (Martins *et al.*, 2015; Koh *et al.*, 2018). En el caso de poblaciones silvestres de abejas andrénidas y de abejorros presentaron múltiples rasgos funcionales complementarios a los de las abejas melíferas en plantaciones de manzanos, cultivo para el cual *A. mellifera* no es considerado muy eficiente (Martins *et al.*, 2015). Por un lado, el comportamiento de las primeras resultó en un mayor número de granos de polen transferidos eficientemente, y por otro lado si bien el número de abejorros fue bajo, presentaron la mayor frecuencia de visitas y mayor actividad recolectora en condiciones climáticas desfavorables. En el caso de polinizadores comerciales, el uso combinado de abejas melíferas y de abejorros *B. pauloensis* estuvo asociado a un incremento en el rinde de manzanos en términos de cuaje de frutos y

número de frutos por árbol (Pérez-Méndez *et al.*, 2020). Beneficios similares fueron obtenidos en el rinde de una plantación de almendros, en la que se liberaron abejas *Osmia lignaria* y se implantaron nidos artificiales en combinación con colmenas de abejas melíferas (Koh *et al.*, 2018).

Por otra parte, teniendo en cuenta el contexto de intensificación agrícola en nuestro país, la cual conlleva una disminución y fragmentación de hábitats naturales y la pérdida de biodiversidad de polinizadores silvestres, resulta relevante desarrollar herramientas para mejorar el desempeño de *A. mellifera*, principal especie utilizada en servicios de polinización de cultivos. Aunque la abeja melífera es un modelo experimental ampliamente utilizado para el estudio de diversos procesos cognitivos vinculados a la memoria y el aprendizaje (von Frisch, 1967; Menzel 1985, 1999), sus habilidades cognitivas no suelen ser consideradas en estudios que aborden temas ecológicos como las interacciones planta-polinizador. En particular la percepción y el aprendizaje de las fragancias florales juegan un rol central en la búsqueda y recolección de recursos afectando tanto las decisiones individuales de las abejas recolectoras como las de la colonia como un todo. En la presente Tesis se desarrollaron dos Formulados Sintéticos específicos a partir de los volátiles presentes en las flores de los cultivos de arándano y de kiwi con el objetivo de sesgar el comportamiento recolector de las abejas de manera dirigida (Capítulo 4). El desarrollo de este tipo de formulaciones implica la colecta e identificación de volátiles florales, la evaluación de distintas mezclas candidatas en ensayos de condicionamiento olfativo, y finalmente, la estimulación de colmenas a campo con el Formulado elegido. Haber podido abarcar las diferentes etapas del desarrollo permitió dimensionar la complejidad y la multiplicidad de factores involucrados en la interacción entre las abejas y estos dos cultivos particulares.

Por un lado, las fragancias florales están compuestas de unos pocos a cientos de compuestos volátiles (Knudsen *et al.*, 1993), cuya concentración relativa puede variar según la fenología de la flor, el momento del día o las condiciones ambientales, y también entre las distintas variedades genéticas (cultivares) de una misma especie (Jakobsen y Olsen, 1994; Schade *et al.*, 2001; Theis y Raguso, 2005; Rodríguez-Saona *et al.*, 2011; Twidle *et al.*, 2017). Los análisis estadísticos preliminares de los volátiles identificados en distintos cultivares de arándano y de kiwi revelaron diferencias significativas entre los perfiles de Emerald y San Joaquín en el caso del arándano, pero no entre Hayward y sus cultivares polinizadores en el caso del kiwi. En particular en los cultivares de kiwi, los compuestos mayoritarios coincidieron entre los genotipos evaluados, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en los condicionamientos olfativos absolutos. Aunque la respuesta de abejas condicionadas a mezclas sintéticas (muchas de las cuales correspondían a mismos componentes en distintas proporciones) frente al olor floral natural fue dispar entre flores femeninas (Hayward) y masculinas,

dichas diferencias no resultaron significativas. No obstante, la disminución en el nivel de respuesta en la fase de evaluación respecto de la fase de entrenamiento sugiere que otros componentes no mayoritarios presentes en las fragancias florales naturales pueden afectar la capacidad de las abejas para discriminar o generalizar entre fragancias sutilmente diferentes. Estudios previos de la composición de volátiles florales de variedades de *Antirrhinum majus*, cuyas fragancias se componen de un menor número de volátiles presentes en todas las variedades, encontraron una correlación entre la diferencia entre los perfiles de los cultivares y la capacidad de las abejas para discriminarlos (Wright *et al.*, 2005). Es decir, que las abejas discriminaron con mayor facilidad aquellas variedades que resultaron más distantes en el análisis discriminante, aún cuando los compuestos volátiles presentes eran los mismos en todos los casos y sólo variaba su concentración relativa. Estos resultados demuestran que las abejas son capaces de percibir diferencias sutiles entre fragancias florales.

Como ya se ha mencionado, no todos los compuestos presentes en las fragancias florales poseen las mismas cualidades perceptuales o saliencia para las abejas (Wright y Smith, 2004). Estudios previos con volátiles florales de cultivos acoplado la técnica de cromatografía gaseosa a electroantenodetección (CG-EAD) o bien a ensayos comportamentales como el protocolo de respuesta de extensión de probóscide (REP), muestran que no todos los componentes de los extractos florales son detectados por las abejas y son biológicamente relevantes, permitiendo identificar aquellos componentes que provocan una respuesta antenal y/o una respuesta comportamental (Henning y Teuber, 1992; Blight *et al.*, 1997; Twidle *et al.*, 2015). Si bien está bien establecido que las abejas melíferas basan el reconocimiento de una fragancia floral en unos pocos compuestos u “olores clave” (Pham-Delègue *et al.*, 1986, 1993; Blight *et al.*, 1997; Laloï *et al.*, 2000; Reinhard *et al.*, 2010), los intentos de dirigir sus visitas hacia un determinado cultivo utilizando néctar aromatizado han llegado a resultados dispares (von Frisch, 1923, 1943, 1967; Free, 1958). Más aún, se ha intentado atraer las abejas hacia el cultivo de interés mediante el rociado de productos comerciales basados en feromonas, como por ejemplo Beescent® o Pollinus®, sin lograr obtener incrementos en el rinde ni un efecto prolongado en el tiempo en muchos de los casos (Loper, 1992; Currie *et al.*, 1992; Schulteis *et al.*, 1994). Tal como se mencionó anteriormente en el Capítulo 4 de la presente Tesis, una de las líneas de investigación del Laboratorio de Insectos Sociales tiene como objetivo desarrollar formulaciones sintéticas que representan una versión simplificada de las fragancias florales de cultivos específicos, como el girasol, manzano, peral y almendro (Farina *et al.*, 2011, 2017, 2018; Farina y Díaz, 2018). La circulación de solución azucarada aromatizada con los Formulados específicos dentro de las colmenas que brindan servicios de polinización facilita el establecimiento de memorias olfativas específicas que sesgan las preferencias recolectoras de las abejas hacia el cultivo de interés. En efecto, el uso de esta tecnología ha dado resultados consistentes en los cultivos mencionados,

provocando un aumento en las actividad recolectora y polinizadora de las abejas, lo cual se tradujo en incrementos significativos de los rendimientos (Díaz, 2013; Susic Martin, 2015; Farina y Díaz, 2018; Farina *et al.*, 2018, 2020). En la presente Tesis, las abejas condicionadas con los Formulados desarrollados para los cultivos de arándano y kiwi mostraron un alto porcentaje de respuesta al olor natural de cada cultivo, es decir, un alto grado de generalización. Ahora bien, los resultados de la estimulación de colmenas a campo no fueron del todo concluyentes, aunque sí suponen un efecto positivo en la actividad general de las colmenas, en particular en la recolección de polen, y en el porcentaje de frutos cuajados (en arándano: 4-12%, y en kiwi: 32% aunque las diferencias fueron significativas sólo en este último). Tales resultados son prometedores e invitan a realizar estudios adicionales, en particular en el caso del kiwi en el cual los perfiles de volátiles florales son complejos (con un alto porcentaje de hidrocarburos insaturados de cadena simple, no comúnmente producidos por las flores; Twidle *et al.*, 2017), y cuyas flores carecen de néctar como recompensa floral, resultando poco atractivas para las abejas. Asimismo, dado que los estudios a campo involucran múltiples variables que son difíciles de controlar (como por ejemplo, las condiciones climáticas, el avance de la floración de los distintos cultivares, el ingreso de las colmenas, y la presencia de flora competitiva cercana) es necesario considerar las particularidades de cada sistema y sopesar las variables a evaluar en cada caso para minimizar la heterogeneidad de cada ambiente, la cual puede enmascarar los efectos de la estimulación olfativa de las colmenas.

Dado el rol central y económicamente dominante que poseen las abejas melíferas en la polinización dirigida de cultivos, este tipo de herramientas, que apuntan a mejorar la eficiencia de este polinizador sin efectos adversos para las colmenas, posee además las ventajas de ser de fácil aplicación para los apicultores, quienes suelen realizar como práctica habitual la alimentación de las colmenas con jarabe azucarado, y de no generar residuos peligrosos para el ambiente. Además, al incentivar la actividad recolectora de las abejas hacia el cultivo permitiría el uso de un menor número de colmenas por hectárea, lo cual es conveniente en un contexto global y regional de pérdida de colmenas y de creciente demanda de servicios de polinización (Aizen y Harder, 2009; IPBES, 2016; Solatina, 2020). Por otra parte, el hecho de que la tecnología desarrollada se basa en las capacidades cognitivas de las abejas para aprender y memorizar olores tiene la potencialidad de ser replicada en otras especies de abejas de dieta generalista, en particular aquellas que han comenzado a ser criadas comercialmente para brindar servicios de polinización. Como ya se ha mencionado en esta Tesis, los abejorros *B. pauloensis* son eficientes polinizadores de cultivos abiertos, semi-cubiertos o de invernadero (Stubbs y Drummond, 2001; Pomeroy y Fisher, 2002; Aldana *et al.*, 2007; Riano *et al.*, 2015). Estudios previos con esta especie nativa han demostrado sus habilidades cognitivas para aprender un olor puro asociado a una recompensa bajo el paradigma de REP (Palottini *et al.*, 2018;

Nery *et al.*, 2021). Más aún, la pre-exposición al alimento aromatizado provocó un mejor desempeño durante el condicionamiento (Palottini *et al.*, 2018), lo cual facilitaría la estimulación olfativa de nidos de abejorros de una manera similar al protocolo utilizado con *A. mellifera* en esta Tesis. Además, se ha demostrado que las memorias olfativas así establecidas pueden ser evocadas 24 y 48 hs posteriores al condicionamiento y ser transferidas a un contexto operante, sesgando sus preferencias recolectoras en una arena hacia flores artificiales aromatizadas con el mismo olor condicionado (Nery *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta las habilidades cognitivas de *B. pauloensis* y su alta eficiencia polinizadora en cultivos como el arándano, se espera seguir profundizando en estas temáticas, estudiando los efectos de la estimulación olfativa en nidos de abejorros brindando servicios de polinización en futuras investigaciones en el laboratorio.

En suma, los resultados de esta Tesis muestran la relevancia de integrar aspectos comportamentales y cognitivos de los polinizadores y su interacción con la biología floral de los cultivos que polinizan, como parte de las estrategias para optimizar su manejo en sistemas agrícolas. La incorporación de las bases químicas de las fragancias florales y de la percepción olfativa de las abejas en el estudio de las interacciones cultivo-polinizador ha sido señalada como potencial estrategia para la atracción de polinizadores (Raguso, 2006; Dötterl y Vereecken, 2010); sin embargo, continúa siendo poco implementada en los programas de desarrollo genético (Vear, 2016; Prasifka *et al.*, 2018). La presente Tesis aporta evidencia acerca de los beneficios potenciales que podrían obtenerse al implementar estrategias de manejo de polinizadores que integren especies nativas, ya sea silvestres o introducidas al cultivo, y/o que utilicen herramientas que influyeran su comportamiento y que puedan así incrementar la polinización de los cultivos.

## Bibliografía

- ABC (2019). Argentine blueberry committee. Campaña 2018. Disponible en <https://www.argblueberry.com/home/estadisticas/>
- Abrahamovich, A.H., Telleria, M.C. y Díaz, N.B. (2001). *Bombus* species and their associated flora in Argentina. *Bee World* 82(2), 76-87.
- Abrol, D.P. (2012). *Pollination Biology* (pp. 37-54). Springer, Dordrecht.
- Aizen, M.A., Aguiar, S., Biesmeijer, J.C., Garibaldi, L.A., Inouye, D.W., Jung, C., Martins, D.J., Medel, R., Morales, C.L., Ngo, H., Pauw, A., Paxton, R.J., Sáez, A. y Seymour, C.L. (2019). Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global change biology*, 25(10), 3516-3527.
- Aizen, M.A. y Harder, L.D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current biology*, 19(11), 915-918.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. y Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology letters*, 6(4), 562-565.
- Aldana, J., Cure, J.R., Almanza, M.T., Vecil, D. y Rodríguez, D. (2007). Effect of *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) on tomato production (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in greenhouse in Bogotá plateau. Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 62-72.
- Andrada, A., Valle, A., Paoloni, P. y Gallez, L. (2004). Pollen and nectar sources used by honeybee colonies pollinating sunflower (*Helianthus annuus*) in the Colorado River Valley, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 39.
- Arbulo, N., Santos, E., Salvarrey, S. y Invernizzi, C. (2011). Proboscis length and resource utilization in two Uruguayan bumblebees: *Bombus atratus* Franklin and *Bombus bellicosus* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology*, 40(1), 72-77
- Arenas, A., Fernández, V.M. y Farina, W.M. (2007). Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Naturwissenschaften*, 94(3), 218-222.
- Aristotle (ca. 340 A.C.). *Historia Animalium*. Publicado en 1970 con traducción al inglés. Cambridge, MA: Harvard University Press.

- Balbuena, M.S., Arenas, A. y Farina, W.M. (2012a). Floral scents learned inside the honeybee hive have a long-lasting effect on recruitment. *Animal Behaviour*, 84(1), 77-83.
- Balbuena, M.S., Molinas, J. y Farina, W.M. (2012b). Honeybee recruitment to scented food sources: correlations between inhive social interactions and foraging decision making. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66:445-452
- Baracchi, D. (2019). Cognitive ecology of pollinators and the main determinants of foraging plasticity. *Current Zoology*, 65: 421–424.
- Benjamin, F.E. y Winfree, R. (2014). Lack of pollinators limits fruit production in commercial blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *Environmental Entomology*, 43(6), 1574-1583.
- Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A. y Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(2), 107-119.
- Blight, M.M., Le Métayer, M., Delègue, M.H.P., Pickett, J.A., Marion-Poll, F. y Wadhams, L.J. (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.
- Breeze, T.D., Vaissière, B.E., Bommarco, R., Petanidou, T., Seraphides, N., Kozak, L., Scheper, J., Biesmeijer, J.C., Kleijn, D., Gyldenkærne, S., Moretti, M., Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Stout, J.C., Pärtel, M., Zobel, M. y Potts, S.G. (2014). Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PloS one*, 9(1), e82996.
- Brittain, C., Williams, N., Kremen, C. y Klein, A.M. (2013). Synergistic effects of non-*Apis* bees and honey bees for pollination services. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1754), 20122767.
- Button, L. y Elle, E. (2014). Wild bumble bees reduce pollination deficits in a crop mostly visited by managed honey bees. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 197, 255-263.
- Byers, K.J., Bradshaw, H.D. y Riffell, J.A. (2014). Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). *Journal of Experimental Biology*, 217(4), 614-623.
- Carew, T.J. (2000) *Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behavior*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Carlazara, G., Polack, L.A. y Silvestre, C. (2013) Efecto de las Colmenas de *Bombus atratus* (Apidae: Hymenoptera) Sobre el Rendimiento y la Calidad de la Fruta Cosechada en Arándanos en la Provincia de Entre Ríos. XXXVI Congreso Argentino de Horticultura
- Carvalho, L.G., Veldtman, R., Shenkute, A.G., Tesfay, G.B., Pirk, C.W.W., Donaldson, J.S. y Nicolson, S.W. (2011). Natural and within-farmland biodiversity enhances crop productivity. *Ecology Letters*, 14(3), 251-259.
- Cavigliasso, P., Bello, F., Rivadeneira, M.F., Monzon, N.O., Gennari, G.P. y Basualdo, M. (2020). Pollination efficiency of managed bee species (*Apis mellifera* and *Bombus pauloensis*) in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) productivity. *Journal of Horticultural Research*, 28(1), 57-64.
- Chamer, A.M., Medan, D., Montaldo, N.H., Mantese, A.I. y Devoto, M. (2020). Visitantes florales del girasol (*Helianthus annuus*) y su vegetación acompañante en la Pampa Interior. *Ecología Austral*, 30(2), 228-238.



- Charrière, J.D., Imdorf, A., Koenig, C., Gallmann, S. y Kuhn, R. (2010). Do sunflowers influence the development of honey bee, *Apis mellifera*, colonies in areas with diversified crop farming?. *Journal of Apicultural Research*, 49(3), 227-235.
- Chittka, L., Gumbert, A. y Kunze, J. (1997). Foraging dynamics of bumble bees: correlates of movements within and between plant species. *Behavioral Ecology*, 8(3), 239-249.
- Chittka, L. y Thomson, J.D. (Eds.). (2001). *Cognitive ecology of pollination: animal behaviour and floral evolution*. Cambridge University Press.
- Cilla, G., Caccavari, M., Bartoloni, N.J. y Roig-Alsina, A. (2012). The foraging preferences of two species of *Melissodes* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Eucerini) in farmed sunflower in Argentina. *Grana*, 51(1), 63-75.
- Clinch, P.G. (1984). Kiwifruit pollination by honey bees 1. Tauranga observations, 1978–81. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 12(1), 29-38.
- Colwell, M.J., Williams, G.R., Evans, R.C. y Shutler, D. (2017). Honey bee-collected pollen in agro-ecosystems reveals diet diversity, diet quality, and pesticide exposure. *Ecology and Evolution*, 7(18), 7243-7253.
- Corbet, S.A. (2006) A typology of pollination systems: implications for crop management and the conservation of wild plants. En: Waser, N.M., Ollerton, J. (Eds.) *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*, University of Chicago Press, Chicago.
- Corbet, S.A., Fussell, M., Ake, R., Fraser, A., Gunson, C., Savage, A. y Smith, K. (1993). Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecological Entomology*, 18(1), 17-30.
- Corti Bielsa, G. (2015). Modelos formales de transferencia de información en insectos eusociales: el rol de la movilidad social y la persistencia informativa como organizadores de una actividad colectiva. Tesis Doctoral FCEN-UBA
- Costa, G., Testolin, R. y Vizzotto, G. (1993). Kiwifruit pollination: an unbiased estimate of wind and bee contribution. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 21(2), 189-195,
- Courcelles, D.M.M., Button, L. y Elle, E. (2013). Bee visit rates vary with floral morphology among highbush blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Applied Entomology*, 137(9), 693-701.
- Currie, R.W., Winston, M.L. y Slessor, K.N. (1992). Effect of synthetic queen mandibular pheromone sprays on honey bee (Hymenoptera: Apidae) pollination of berry crops. *Journal of Economic Entomology*, 85(4), 1300-1306.
- Dafni, A., Kevan, P., Gross, C.L. y Goka, K. (2010). *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45(1), 101-113.
- David, M.A., Yommi, A. y Sánchez, E. (2020). Elección del terreno y plantación del cultivo de kiwi. Buenos Aires: Ediciones INTA, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, 2020. 39 p.: il. (en PDF)
- Degrandi-Hoffman, G. y Chambers, M. (2006). Effects of honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging on seed set in self-fertile sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Environmental Entomology*, 35(4), 1103-1108.

- DeGrandi-Hoffman, G. y Martin, J.H. (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.
- DeGrandi-Hoffman G, y Martin J.H. (1995). Does a honey bee (*Apis mellifera*) colony's foraging population on male-fertile sunflowers (*Helianthus annuus*) affect the amount of pollen on nestmates foraging on malesteriles? *Journal of Apicultural Research*, 34: 109–114.
- DeGrandi-Hoffman, G. y Watkins, J.C. (2000). The foraging activity of honey bees *Apis mellifera* and non—*Apis* bees on hybrid sunflowers (*Helianthus annuus*) and its influence on cross—pollination and seed set. *Journal of Apicultural Research*, 39(1-2), 37-45.
- Delaplane, K.S. y Mayer, D.F. (2000). *Crop pollination by bees*. 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., Arenas, A., Fernández, V.M., Susic Martin, C., Basilio, A.M. y Farina, W.M. (2013). Honeybee cognitive ecology in a fluctuating agricultural setting of apple and pear trees. *Behavioral Ecology*, 24(5), 1058-1067.
- Díaz, S.A., Argüello, A., Alfaro, G., Kirschbaum, D.S. y Gennari, G. (2013a). Efecto Polinizador de *Bombus atratus* Sobre Arándanos (*Vaccinium* sp.) en la Provincia de Tucumán. XXXVI Congreso Argentino de Horticultura
- Díaz, S.A., Roger, S.L., Yacumo, D.M., Kirschbaum, D.S. y Gennari, G. (2013b). Efecto polinizador de *Bombus atratus* sobre Frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) en la provincia de Tucumán. XXXVI Congreso Argentino de Horticultura
- Dobson, H.E.M. (1991). Analysis of flower and pollen volatiles. En: Linskens, H.F., Jackson, J.F. (Eds.) *Essential oils and waxes* (pp. 231-251). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Dobson, H.E.M. (2006). Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. En: Dudareva, N., y Pichersky, E. (Eds): *Biology of floral scent*. 147-198.
- Dogterom, M.H. y Winston, M.L. (1999). Pollen storage and foraging by honey bees (Hymenoptera: Apidae) in highbush blueberries (Ericaceae), cultivar Bluecrop. *The Canadian Entomologist*, 131(6), 757-768.
- Dogterom, M.H., Winston, M.L. y Mukai, A. (2000). Effect of pollen load size and source (self, outcross) on seed and fruit production in highbush blueberry cv. 'Bluecrop' (*Vaccinium corymbosum*; Ericaceae). *American Journal of Botany*, 87(11), 1584-1591.
- Dolezal, A.G., Clair, A.L. S., Zhang, G., Toth, A.L. y O'Neal, M.E. (2019). Native habitat mitigates feast–famine conditions faced by honey bees in an agricultural landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(50), 25147-25155.
- Dötterl, S. y Vereecken, N.J. (2010). The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology*, 88(7), 668-697.

- Dukas, R. (Ed.). (1998). *Cognitive ecology: the evolutionary ecology of information processing and decision making*. University of Chicago Press.
- Estravis-Barcala, M.C., Palottini, F., y Farina, W.M. (2019). Honey bee and native solitary bee foraging behavior in a crop with dimorphic parental lines. *PLoS one*, 14(10), e0223865.
- Estravis-Barcala, M.C., Palottini, F., Macri, I., Nery, D., y Farina, W.M. (2021). Managed honeybees and South American bumblebees exhibit complementary foraging patterns in highbush blueberry. *Scientific Reports*, 11(1), 1-11.
- Faegri, K. y van der Pijl, L. (1979). *The principles of pollination ecology*. 3d rev. ed. Pergamon, Oxford.
- Farina, W.M., Arenas, A., Díaz, P.C., Susic Martin, C. y Estravis Barcala, M. C. (2020). Learning of a mimic odor within beehives improves pollination service efficiency in a commercial crop. *Current Biology*, 30(21), 4284-4290.
- Farina W.M. y Díaz P.C. (2018). Solicitud de patente en fase internacional n° PCT/IB2018/055550. Formulada que promueve la polinización dirigida de abejas melíferas hacia cultivos de perales.
- Farina W.M., Díaz, P.C. y Arenas, A. (2011). Acta: P 20110102441. Una formulación que promueve la polinización dirigida de abejas melíferas hacia cultivos de manzano. Instituto Nacional de Propiedad Intelectual.
- Farina W.M., Díaz, P.C. y Arenas, A. (2017). Patente AR082846B1. Una formulación que promueve la polinización dirigida de abejas melíferas hacia cultivos de girasol. Instituto Nacional de Propiedad Intelectual.
- Farina W.M., Estravis Barcala, M.C. y Palottini, F. (2018a). Solicitud de patente en fase internacional n° PCT/IB2018/055549. Formulada que promueve la polinización dirigida de abejas melíferas hacia cultivos de almendro.
- Farina, W.M. y Grüter, C. (2009). Trophallaxis: a mechanism of information transfer, p. 183-197. En Hrncir, M. y Jarau, S. (Eds.) *Food exploitation by social insects: ecological, behavioral, and theoretical approaches*. CRC Press, Boca Raton.
- Farina, W.M., Grüter, C., Acosta, L. y Mc Cabe, S. (2007). Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften*, 94(1), 55-60.
- Farina, W.M., Grüter, C. y Díaz, P.C. (2005). Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1575), 1923-1928.
- FAOSTAT (2021). Food and Agriculture Organization Corporate statistical database. Datos extraídos de <http://www.fao.org/faostat/en>
- Ferguson, A.R. (1984). Kiwifruit: a botanical review. *Horticultural Reviews*, 6, 1-64.
- Ferguson, A.R. (2016). Botanical description. En Testolin, R., Huang, H., y Ferguson, A.R. (Eds.) *The Kiwifruit Genome* (pp. 1-13). Springer, Cham.
- Fernández, F. y Sharkey, M.J. (2006). *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. Sociedad Colombiana de Entomología, Bogotá D.C.

- Fewell, J.H. y Page, R.E. (1993). Genotypic variation in foraging responses to environmental stimuli by honey bees, *Apis mellifera*. *Experientia*, 49(12), 1106-1112.
- Fick, G.N. (1978). Breeding and genetics. p. 279-338. En Carter, J.F. (ed.) Sunflower science and technology. *Agronomy Monographs 19*. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, W
- Fick, G.N., y Miller, J.F. (1997). Sunflower breeding. *Sunflower Technology and Production*, 35, 395-439.
- Free, J.B. (1958). Attempts to condition bees to visit selected crops. *Bee World*, 39(9), 221-230.
- Free, J.B. (1963). The flower constancy of honeybees. *The Journal of Animal Ecology*, 119-131.
- Free, J.B. (1965). Attempts to increase pollination by spraying crops with sugar syrup. *Journal of Apicultural Research*, 4(1), 61-64.
- Free, J.B. (1967). Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Animal Behaviour*. 15:134–144
- Free, J.B. (1970). The flower constancy of bumblebees. *The Journal of Animal Ecology*, 395-402.
- Gabai-Hazera, A., Vaissière, B.E., Blacquièrre, T., Freitas, B.M., Allsopp, M., Chabert, S. y Dag, A. (2018). Protocol for using pollinators in hybrid vegetable seed production. ISF Working Group Vegetable Seed Production.
- García Rubio, J.C., García González de Lena, G., y Ciordia Ara, M. (2015). El cultivo del kiwi. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)
- Garibaldi, L.A., Carvalheiro, L.G., Leonhardt, S.D., Aizen, M.A., Blaauw, B.R., Isaacs, R., Kuhlmann, M., Kleijn, D., Klein, A.M., Kremen, C., Morandin, L., Scheper, J. y Winfree, R. (2014). From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(8), 439-447.
- Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S. A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G., Harder, L.D., Afik, O., Bartomeus, I., Benjamin, F., Boreux, V., Cariveau, D., Chacoff, N.P., Dudenhöffer, J.H., Freitas, B.M., Ghazoul, J., Greenleaf, S., ... Klein, A.M. (2013) Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 339(6127):1608–1611.
- Gherman, B.I., Denner, A., Bobiş, O., Dezmirean, D.S., Mărghițaș, L.A., Schlüns, H., Moritz, R.F.A. y Erler, S. (2014). Pathogen-associated self-medication behavior in the honeybee *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(11), 1777-1784.
- Giacomini, J.J., Leslie, J., Tapy, D.R., Palmer-Young, E.C., Irwin, R.E. y Adler, L.S. (2018). Medicinal value of sunflower pollen against bee pathogens. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Gibbs, J., Elle, E., Bobiwash, K., Haapalainen, T. y Isaacs, R. (2016). Contrasting pollinators and pollination in native and non-native regions of highbush blueberry production. *PloS one*, 11(7), e0158937.
- Gil, M. y De Marco, R.J. (2005). Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 208(4), 671-680.

- Girard, M., Chagnon, M. y Fournier, V. (2012). Pollen diversity collected by honey bees in the vicinity of *Vaccinium* spp. crops and its importance for colony development. *Botany*, 90(7), 545-555.
- 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.
- Goodwin, R.M., Houten, A.T. y Perry, J.H. (1999). Effect of staminate kiwifruit vine distribution and flower number on kiwifruit pollination. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 27:63-67.
- Goodwin, R.M. y Steven, D. (1993). Behaviour of honey bees visiting kiwifruit flowers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 21(1), 17-24.
- Goulson, D. (2010). *Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation*. Oxford University Press on Demand.
- Grant, V. (1950). The flower constancy of bees. *The Botanical Review*, 16(7), 379-398.
- Greenleaf, S.S. y Kremen, C. (2006). Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13890-13895.
- Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.C. y Giurfa, M. (2005). Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol*, 3(4), e60.
- Henning, J.A. y Teuber, L.R. (1992). Combined Gas Chromatography-Electroantennogram Characterization of Alfalfa Floral Volatiles Recognized by Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 85(1), 226-232.
- Herbert, E.W. (1992). Honey bee nutrition. En Graham, J.E. (Ed.), *The hive and the honey bee* (pp. 197–233). Hamilton, IL: Dadant & Sons.
- Hill, P.S., Wells, P.H. y Wells, H. (1997). Spontaneous flower constancy and learning in honey bees as a function of colour. *Animal Behaviour*, 54(3), 615-627.
- Hoehn, P., Tschardt, T., Tylianakis, J. M. y Steffan-Dewenter, I. (2008). Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1648), 2283-2291.
- Hoffman, G.D., Lande, C. y Rao, S. (2018). A novel pollen transfer mechanism by honey bee foragers on highbush blueberry (Ericales: Ericaceae). *Environmental Entomology*, 47(6), 1465-1470.
- Hölldobler, B. y Wilson, E.O. (2008). *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. W. W. Norton Company, New York.
- Hopping, M. E., & Hacking, N. J. A. (1982). A comparison of pollen application methods for the artificial pollination of kiwifruit. *Fruit Set and Development*, XXI IHC 139, 41-50.
- Howpage, D., Spooner-Hart, R.N. y Vithanage, V. (2001). Influence of honey bee (*Apis mellifera*) on kiwifruit pollination and fruit quality under Australian conditions. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29(1), 51-59.

- Hrncir, M., Maia-Silva, C., Mc Cabe, S.I. y Farina, W.M. (2011). The recruiter's excitement—features of thoracic vibrations during the honey bee's waggle dance related to food source profitability. *Journal of Experimental Biology*, 214(23), 4055-4064.
- Inouye, D.W. (1980). The terminology of floral larceny. *Ecology*, 61(5), 1251-1253.
- IPBES (2016). Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V.L. Imperatriz-Fonseca, H. T. Ngo, J.C. Biesmeijer, T.D. Breeze, L.V. Dicks, L.A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele, A.J. Vanbergen, M.A. Aizen, S.A. Cunningham, C. Eardley, B.8 M. Freitas, N. Gallai, P.8 G. Kevan, A. Kovács-Hostyánszki, P.K. Kwapong, J. Li, X. Li, D.J. Martins, G. Nates-Parra, J.S. Pettis, R. Rader y B.F. Viana (Eds.). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 36 pages
- Isaacs, R. y Kirk, A.K. (2010). Pollination services provided to small and large highbush blueberry fields by wild and managed bees. *Journal of Applied Ecology*, 47(4), 841-849.
- Jakobsen, H.B. y Olsen, C.E. (1994). Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta*, 192(3), 365-371.
- Javorek, S.K., Mackenzie, K.E. y Vander Kloet, S.P. (2002). Comparative pollination effectiveness among bees (Hymenoptera: Apoidea) on lowbush blueberry (Ericaceae: *Vaccinium angustifolium*). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(3), 345-351.
- Jay, D. y Jay, C. (1984). Observations of honeybees on Chinese gooseberries ('kiwifruit') in New Zealand. *Bee World*, 65(4), 155-166.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (1992). *Principles of neural science*. New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier.
- Kawagoe, T., y Suzuki, N. (2004). Cryptic dioecy in *Actinidia polygama*: a test of the pollinator attraction hypothesis. *Canadian Journal of Botany*, 82(2), 214-218.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W. y Waser, N.M. (1998). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 83-112.
- King, M.J. y Buchmann, S.L. (2003). Floral sonication by bees: mesosomal vibration by *Bombus* and *Xylocopa*, but not *Apis* (Hymenoptera: Apidae), ejects pollen from poricidal anthers. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 295-305.
- King, M.J., y Ferguson, A.M. (1991). Collection and use of dry pollen for pollination of kiwifruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 19(4), 385-389.
- Klein, A.M., Brittain, C., Hendrix, S.D., Thorp, R., Williams, N. y Kremen, C. (2012). Wild pollination services to California almond rely on semi-natural habitat. *Journal of Applied Ecology*, 49(3), 723-732.
- Klein, A.M., Muller, C., Hoehn, P. y Kremen, C. (2009). Understanding the role of species richness for crop pollination services. En: Naeem, S., Bunker, D.E., Hector, A., Loreau, M. y Perrings, C. (Eds.) *Biodiversity, Ecosystem Functioning, and Human Well-Being – an Ecological and Economic Perspective*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 195–208.

- Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C. y Tscharrntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L. y Bergström, L.G. (1993). Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33(2), 253-280.
- Koh, I., Lonsdorf, E.V., Artz, D.R., Pitts-Singer, T.L. y Ricketts, T. H. (2018). Ecology and economics of using native managed bees for almond pollination. *Journal of Economic Entomology*, 111(1), 16-25.
- Kremen, C., Williams, N.M. y Thorp, R.W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16812-16816.
- Laloi, D., Bailez, O., Blight, M.M., Roger, B., Pham-Delègue, M.H. y Wadhams, L.J. (2000). Recognition of complex odors by restrained and free-flying honeybees, *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology*, 26(10), 2307-2319.
- Leclercq, P. (1969). Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 19(2), 99-106.
- Lindauer, M. (1952). Ein beitrag zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 34(4), 299-345.
- Lindauer, M. (1961) *Communication among social bees*. Harvard University Press, Cambridge.
- Loper, G. M. (1992). Experimental use of Beescent® to influence honey bee visitation to watermelon. *Vegetable Report College of Agriculture, University of Arizona*
- Louveaux, J. (1959). Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifica* L.)(Fin). *Les Annales de l'Abeille*, 2(1), 13-111.
- MacFarlane, R.P. y Ferguson, A.M. (1983). Kiwifruit pollination: a survey of the insect pollinators in New Zealand. V *Symposium International sur la Pollination*: 367-373
- MacKenzie, K.E. (1997). Pollination requirements of three highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(6), 891-896.
- Mader, E., Spivak, M. y Evans, E. (2010). *Managing alternative pollinators*. NRAES. Ithaca.
- Mallinger, R.E., Bradshaw, J., Varenhorst, A.J. y Prasifka, J.R. (2019). Native solitary bees provide economically significant pollination services to confection sunflowers (*Helianthus annuus* L.)(Asterales: Asteraceae) grown across the northern Great Plains. *Journal of Economic Entomology*, 112(1), 40-48.
- Mallinger, R.E. y Gratton, C. (2015). Species richness of wild bees, but not the use of managed honeybees, increases fruit set of a pollinator-dependent crop. *Journal of Applied Ecology*, 52(2), 323-330.
- Mallinger, R.E. y Prasifka, J.R. (2017). Bee visitation rates to cultivated sunflowers increase with the amount and accessibility of nectar sugars. *Journal of applied entomology*, 141(7), 561-573.
- Mandelik, Y., Winfree, R., Neeson, T. y Kremen, C. (2012). Complementary habitat use by wild bees in agro-natural landscapes. *Ecological Applications*, 22(5), 1535-1546.

- Martins, K.T., Gonzalez, A. y Lechowicz, M.J. (2015). Pollination services are mediated by bee functional diversity and landscape context. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 200, 12-20.
- Mauelshagen, J. y Greggers, U. (1993). Experimental access to associative learning in honeybees. *Apidologie*, 24(3), 249-266.
- McGregor, S.E. (1976). *Insect pollination of cultivated crop plants* (No. 496). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Medan, D., Torretta, J.P., Hodara, K., Elba, B. y Montaldo, N.H. (2011). Effects of agriculture expansion and intensification on the vertebrate and invertebrate diversity in the Pampas of Argentina. *Biodiversity and Conservation*, 20(13), 3077-3100.
- Menzel, R. (1985). Learning in honey bees in an ecological and behavioral context. En: Holldobler B., Lindauer M., (Eds) *Experimental behavioral ecology and sociobiology*. New York: Gustav Fischer. pp. 55-74.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 185(4), 323-340.
- Menzel, R. (2001). Behavioral and neural mechanisms of learning and memory as determinants of flower constancy. En: Chittka, L. y Thomson, J.D. (Eds) *Cognitive Ecology of Pollination*: 21-40. Cambridge University Press, New York.
- Menzel, R., y Erber, J. (1978). Learning and memory in bees. *Scientific American*, 239(1), 102-111.
- Michener, C.D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press, Cambridge.
- Michener, C.D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). The Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2020). Cadena de Kiwi. Enero 2020. Secretaría de Alimentos y Bioeconomía Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas. Dirección de Cadenas Alimentarias (DCA). Disponible en [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Cadenas%20de%20Valor%20de%20Alimentos%20y%20Bebidas/informes/Resumen\\_Cadena\\_KIWI\\_ENERO\\_2020.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Cadenas%20de%20Valor%20de%20Alimentos%20y%20Bebidas/informes/Resumen_Cadena_KIWI_ENERO_2020.pdf)
- Monasterolo, M., Poggio, S.L., Medan, D. y Devoto, M. (2020). Wider road verges sustain higher plant species richness and pollinator abundance in intensively managed agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 302, 107084.
- Moquet, L., Bruyère, L., Pirard, B. y Jacquemart, A.L. (2017). Nectar foragers contribute to the pollination of buzz-pollinated plant species. *American Journal of Botany*, 104(10), 1451-1463.
- Morales, C.L., Arbetman, M.P., Cameron, S.A, y Aizen, M.A. (2013). Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(10), 529-534.
- Müller, J.L., Steyn, W.J. y Theron, K.I. (2013). The effect of cross-pollination of southern highbush blueberries on fruit set and fruit characteristics. En *II All Africa Horticulture Congress 1007*, 571-578.



- Nery, D., Palottini, F. y Farina, W.M. (2021). Classical olfactory conditioning promotes long-term memory and improves odor-cued flight orientation in the South American native bumblebee *Bombus pauloensis*. *Current Zoology*, 67(5), 561-563.
- Nicolson, S.W., Nepi, M. y Pacini, E. (Eds.). (2007). *Nectaries and nectar* (Vol. 4). Dordrecht: Springer.
- Nieuwenhuizen, N.J., Wang, M.Y., Matich, A.J., Green, S.A., Chen, X., Yauk, Y.K., Beuning, L.L., Nagegowda, D.A., Dudareva, N. y Atkinson, R.G. (2009). Two terpene synthases are responsible for the major sesquiterpenes emitted from the flowers of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3203-3219.
- Núñez, J.A. (1982). Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *Journal of Apicultural Research*, 21(3), 139-150.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P. , McGlenn, D., Minchin, P. R. , O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. , Szoecs, E. y Wagner, H. (2018). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Orians, G.H. y Pearson, N.E. (1979). On the theory of central place foraging. En: Horn, D.J., Mitchell, R.D., Stairs, G.R. (Eds.) *Analysis of Ecological Systems*, Ohio State University Press, Columbus, pp. 154-177
- Osterman, J., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Bosch, J., Howlett, B.G., Inouye, D.W., Jung, C. Martins, D.J., Medel, R., Pauw, A., Seymour, C.L. y Paxton, R.J. (2021). Global trends in the number and diversity of managed pollinator species. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 322, 107653.
- Pacini, E. y Nepi, M. (2007). Nectar production and presentation. En *Nectaries and nectar* (pp. 167-214). Dordrecht: Springer.
- Palmer-Jones, T. y Clinch, P.G. (1974). Observations on the pollination of Chinese gooseberries variety 'Hayward'. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 2(4), 455-458.
- Palmer-Young, E.C., Farrell, I.W., Adler, L.S., Milano, N.J., Egan, P.A., Junker, R.R., Irwin, R.E. y Stevenson, P.C. (2019). Chemistry of floral rewards: intra-and interspecific variability of nectar and pollen secondary metabolites across taxa. *Ecological Monographs*, 89(1), e01335.
- Palottini, F., Estravis Barcala, M.C. y Farina, W.M. (2018). Odor learning and its experience-dependent modulation in the South American native bumblebee *Bombus atratus* (Hymenoptera: apidae). *Frontiers in psychology*, 9, 603.
- Pankiw, T., Page Jr, R.E. y Fondrk, M.K. (1998). Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral ecology and sociobiology*, 44(3), 193-198.
- Parker, F.D. (1981). Sunflower pollination: abundance, diversity and seasonality of bees and their effect on seed yields. *Journal of Apicultural Research*, 20(1), 49-61.
- Pavlov, I. (1927) *Conditioned reflexes*. Oxford: Oxford University Press. 430 p
- Percival, M.S. (1955). The presentation of pollen in certain angio-sperms and its collection by *Apis mellifera*. *New Phytologist*, 54(3), 353-368.

- Pérez-Méndez, N., Andersson, G.K., Requier, F., Hipólito, J., Aizen, M.A., Morales, C. L., García, N., Gennari, G.P. y Garibaldi, L.A. (2020). The economic cost of losing native pollinator species for orchard production. *Journal of Applied Ecology*, 57(3), 599-608.
- Pernal, S.F. y Currie, R.W. (2001). The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(1), 53-68.
- Pham-Delègue, M.H., Bailez, O., Blight, M.M., Masson, C., Picard-Nizou, A.L. y Wadhams, L.J. (1993). Behavioural discrimination of oilseed rape volatiles by the honeybee *Apis mellifera* L. *Chemical Senses*, 18(5), 483-494.
- Pham-Delègue, M.H., Etievant, P., Guichard, E. y Masson, C. (1989). Sunflower volatiles involved in honeybee discrimination among genotypes and flowering stages. *Journal of Chemical Ecology*, 15(1), 329-343.
- Pham-Delègue, M.H., Masson, C., Etievant, P. y Azar, M. (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.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team (2019). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-142, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.
- Pomeroy, N. y Fisher, R.M. (2002). Pollination of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by bumble bees (*Bombus terrestris*): effects of bee density and patterns of flower visitation. *New Zealand Entomologist*, 25(1), 41-49.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. y Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353.
- Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H.T., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Breeze, T.D., Dicks, L.V., Garibaldi, L.A., Hill, R., Settele, J. y Vanbergen, A.J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632), 220-229.
- Prasifka, J.R., Mallinger, R.E., Portlas, Z.M., Hulke, B.S., Fugate, K.K., Paradis, T., Hampton, M.E. y Carter, C.J. (2018). Using nectar-related traits to enhance crop-pollinator interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 812.
- Przybylska, A., Ówintal, M., Pszczółkowski, P. y Sawicka, B. (2021). Effect of Attractants and Micronutrient Biofortification on the Yield and Quality of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) Seeds. *Agronomy*, 11(1), 152.
- R Core Team (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, <https://www.R-project.org>
- Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L.A., Garratt, M.P., Howlett, B.G., Winfree, R., Cunningham, S.A., Mayfield, M.M., Arthur, A.D., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Brittain, C., Carvalheiro, L.G., Chacoff, N.P., Entling, M.H., Foully, B., Freitas, B.M., Gemmil-Herren, B., Ghazoul, J., Griffin, S.R., Gross, C.L., Herbertsson, L., Herzog, F., Hipólito, J., Jaggard, S., Jauker, F., Klein, A.M., Kleijn, D., Krishnan, S., Lemos, C.Q., Lindström, S.A.M., Mandelík, Y., Monteiro, V.M., Nelson, W., Nilsson, L., Pattemore, D.E., de O. Pereira, N., Pisanty, G., Potts, S.G., Reemer, M., Rundlöf, M., Sheffield, C.S., Scheper, J., Schüepp, C., Smith, H.G., Stanley, D.A., Stout, J.C., Szentgyörgyi, H., Taki, H., Vergara, C.H., Viana, B.F. y Woyciechowski, M. (2016). Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(1), 146-151.

- Rader, R., Cunningham, S.A., Howlett, B.G. y Inouye, D.W. (2020). Non-bee insects as visitors and pollinators of crops: Biology, ecology, and management. *Annual Review of Entomology*, 65, 391-407.
- Rader, R., Howlett, B.G., Cunningham, S.A., Westcott, D.A. y Edwards, W. (2012). Spatial and temporal variation in pollinator effectiveness: do unmanaged insects provide consistent pollination services to mass flowering crops?. *Journal of Applied Ecology*, 49(1), 126-134.
- Raguso, R.A. (2004). Flowers as sensory billboards: progress towards an integrated understanding of floral advertisement. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 434-440.
- Raguso, R.A. (2006). Behavioral responses to floral scent: experimental manipulations and the interplay of sensory modalities. En: Dudareva, N., y Pichersky, E. (Eds) *Biology of floral scent* (pp. 297-336).
- Raguso, R.A. (2008). Start making scents: the challenge of integrating chemistry into pollination ecology. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(1), 196-207.
- Reinhard, J., Sinclair, M., Srinivasan, M.V. y Claudianos, C. (2010). Honeybees learn odour mixtures via a selection of key odorants. *PloS one*, 5(2), e9110.
- Riano, D., Pacateque, J., Cure, J.R. y Rodriguez, D. (2015). Pollination behavior and efficiency of *Bombus atratus* Franklin in sweet peppers (*Capsicum annum* L.) grown in a greenhouse. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 9, 259–267.
- Riffell, J.A., Lei, H., Christensen, T.A. y Hildebrand, J.G. (2009). Characterization and coding of behaviorally significant odor mixtures. *Current Biology*, 19(4), 335-340.
- Ritzinger, R. y Lyrene, P.M. (1999). Flower morphology in blueberry species and hybrids. *HortScience*, 34(1), 130-131.
- Rodriguez-Saona, C., Parra, L., Quiroz, A. y Isaacs, R. (2011). Variation in highbush blueberry floral volatile profiles as a function of pollination status, cultivar, time of day and flower part: implications for flower visitation by bees. *Annals of Botany*, 107(8), 1377-1390.
- Rogers, S.R., Tarpy, D.R. y Burrack, H.J. (2013). Multiple criteria for evaluating pollinator performance in highbush blueberry (Ericales: Ericaceae) agroecosystems. *Environmental Entomology*, 42(6), 1201-1209.
- Roig Alsina, A. (2008) Apiformes (abejas). En: Biodiversidad de artrópodos argentinos II. (Eds: Claps, L.; Debandi, G. y Roig-Juñent, S.) Sociedad Entomológica Argentina ediciones, Tucumán, Pp. 373-390.
- Rossi, N., Santos, E., Salvarrey, S., Arbulo, N. e Invernizzi, C. (2015). Determination of flower constancy in *Bombus atratus* Franklin and *Bombus bellicosus* Smith (Hymenoptera: Apidae) through palynological analysis of nectar and corbicular pollen loads. *Neotropical Entomology*, 44(6), 546-552.
- Roubik, D.W. (Ed.). (2018a). *The pollination of cultivated plants: A compendium for practitioners, vol 1*. (2ª edición) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma. Italia. ISBN 978-92-5-130512-6
- Roubik, D.W. (Ed.). (2018b). *The pollination of cultivated plants: A compendium for practitioners, vol 2*. (2ª edición) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia. ISBN 978-92-5-130506-5
- Roy, R., Schmitt, A.J., Thomas, J.B. y Carter, C.J. (2017). Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science*, 262, 148-164.

- Sáez, A., Sabatino, M. y Aizen, M.A. (2012). Interactive effects of large-and small-scale sources of feral honeybees for sunflower in the Argentine Pampas. *PLoS One*, 7(1), e30968.
- Sandoz, J.C., Laloi, D., Odoux, J.F. y Pham-Delègue, M.H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Animal Behaviour*, 59(5), 1025-1034.
- Schade, F., Legge, R.L. y Thompson, J. E. (2001). Fragrance volatiles of developing and senescing carnation flowers. *Phytochemistry*, 56(7), 703-710.
- Schmid, R. (1978). Reproductive anatomy of *Actinidia chinensis* (Actinidiaceae). *Botanischer Jahrbuch für Systematik* 100: 149–195.
- Schultheis, J.R., Ambrose, J.T., Bambara, S.B. y Mangum, W.A. (1994). Selective bee attractants did not improve cucumber and watermelon yield. *HortScience*, 29(3), 155-158.
- 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. (1995). *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press, Cambridge.
- Shepard, R.N. (1987). Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science*, 237(4820), 1317-1323.
- Skinner, B.F. (1938) *The behavior of organisms*. Appleton, New York
- Smith, B.H., Wright, G.A. y Daly, K.C. (2006). Learning-Based Recognition and Discrimination of Floral Odors. En: Dudareva, N., y Pichersky, E. (Eds) *Biology of floral scent*.
- SOLATINA (2020). Científicos alertan sobre la muerte de abejas en Latinoamérica. Gacetilla de prensa. Disponible en <https://solatina.org/temas-de-estudio/monitoreo/> (último acceso 30/03/2021).
- Somerville, D.C. (2001). *Nutritional Value of Bee Collected Pollens: A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation; RIRDC Project No DAN-134A*. RIRDC.
- St. Clair, A.L., Zhang, G., Dolezal, A.G., O'Neal, M.E. y Toth, A.L. (2020). Diversified farming in a monoculture landscape: Effects on honey bee health and wild bee communities. *Environmental Entomology*, 49(3), 753-764.
- Stubbs, C.S. y Drummond, F.A. (2001). *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae): an alternative to *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) for lowbush blueberry pollination. *Journal of Economic Entomology*, 94(3), 609-616.
- Susic Martin, C. (2015). Comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* en cultivos comerciales: estudios descriptivos y evaluación de herramientas que mejoran su eficacia polinizadora. Tesis Doctoral FCEN-UBA
- Susic Martin, C. y Farina, W.M. (2016). Honeybee floral constancy and pollination efficiency in sunflower (*Helianthus annuus*) crops for hybrid seed production. *Apidologie*, 47(2), 161-170.

- Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3), 168-179.
- Tepedino, V.J. (1979). The importance of bees and other insect pollinators in maintaining floral species composition. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 3, 139-150.
- Testolin, R. (1991). Male density and arrangement in kiwifruit orchards. *Scientia Horticulturae*, 48(1-2), 41-50.
- Theis, N. y Raguso, R.A. (2005). The effect of pollination on floral fragrance in thistles. *Journal of Chemical Ecology*, 31(11), 2581-2600.
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U.S. y Schnitzler, J.P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45(4), 540-560.
- Thomson, J.D. y Goodell, K. (2001). Pollen removal and deposition by honeybee and bumblebee visitors to apple and almond flowers. *Journal of Applied Ecology*, 38(5), 1032-1044.
- Torretta, J.P., Medan, D., Roig Alsina, A.H. y Montaldo, N.H. (2010). Visitantes florales diurnos del girasol (*Helianthus annuus* L., Asterales: Asteraceae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69 (1-2), 17-32.
- Tuell, J.K., Ascher, J.S. y Isaacs, R. (2009). Wild bees (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) of the Michigan highbush blueberry agroecosystem. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(2), 275-287.
- Twidle, A.M., Suckling, D.M., Seal, A.G., Fedrizzi, B., Pilkington, L.I. y Barker, D. (2017). Identification of in situ flower volatiles from kiwifruit (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*) cultivars and their male pollenisers in a New Zealand orchard. *Phytochemistry*, 141, 61-69.
- Vaissière, B.E., Freitas, B.M., Gemmill-Herren, B. (2011). Protocol to detect and assess pollination deficits in crops: a handbook for its use. Rome: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- Vaissière, B.E., Rodet, G., Cousin, M., Botella, L. y Torré Grossa, J.P. (1996). Pollination effectiveness of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in a kiwifruit orchard. *Journal of Economic Entomology*, 89(2), 453-461.
- Vanbergen, A.J. y the Insect Pollinators Initiative. (2013). Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11: 251–59
- Vear, F. (2016). Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 23(2), 1-8.
- Velthuis, H.H. y Van Doorn, A. (2006). A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4), 421-451.
- von Frisch, K. (1919). Über den Geruchsinn der Bienen und seine blütenbiologische Bedeutung. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie*, 37, 1-238.
- von Frisch, K. (1923). Über die Sprache der Bienen. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie*, 40:1-186.
- von Frisch, K. (1943). Versuche über die lenkung des bienenfluges durch dufstoffe. (Experiments on the control of the flight of bees through scents). *Naturwissenschaften*, 31, 445–460

- von Frisch, K. (1967). *The dance language and orientation of bees*. Harvard University Press, Cambridge
- Waddington, K.D. y Herbst, L.H. (1987). Body size and the functional length of the proboscis of honey bees. *Florida Entomologist*, 124-128
- Waser, N.M. (1986). Flower constancy: definition, cause, and measurement. *The American Naturalist*, 127(5), 593-603.
- Williamson, J.G. y Lyrene, P.M. (2004). Blueberry varieties for Florida. *EDIS*, 2004(7).
- Willmer, P.G., Bataw, A.A.M. y Hughes, J.P. (1994). The superiority of bumblebees to honeybees as pollinators: insect visits to raspberry flowers. *Ecological Entomology*, 19(3), 271-284.
- Winfree, R.W. Fox, J., Williams, N.M., Reilly, J.R. y Cariveau, D.P. (2015). Abundance of common species, not species richness, drives delivery of a real-world ecosystem service. *Ecology Letters*, 18(7), 626-635.
- Winston, M.L. (1987). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press. Cambridge
- Woodcock, B.A., Garratt, M. P. D., Powney, G. D., Shaw, R. F., Osborne, J. L., Soroka, J., Lindström, S.A.M., Stanley, D., Ouvrard, P., Edwards, M.E., Jauker, F., McCracken, M.E., Zou, Y., Potts, S.G., Rundlöf, M., Noriega, J.A., Greenop, A., Smith, H.G., Bommarco, R.,... y Pywell, R.F. (2019). Meta-analysis reveals that pollinator functional diversity and abundance enhance crop pollination and yield. *Nature Communications*, 10(1), 1-10.
- Wright, G.A., Lutmerding, A., Dudareva, N. y Smith, B.H., Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honey bees (*Apis mellifera*), *Journal of Comparative Physiology A*, 191(2), 105-114.
- Wright, G.A. y Schiestl, F.P. (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
- Wright, G.A., Skinner, B.D. y Smith, B.H. (2002). Ability of honeybee, *Apis mellifera*, to detect and discriminate odors of varieties of canola (*Brassica rapa* and *Brassica napus*) and snapdragon flowers (*Antirrhinum majus*). *Journal of Chemical Ecology*, 28(4), 721-740.
- Wright, G.A. y Smith, B.H. (2004). Different thresholds for detection and discrimination of odors in the honey bee (*Apis mellifera*). *Chemical Senses*, 29(2), 127-135.
- Wright, G.A., Thomson, M.G. y Smith, B.H. (2005). Odour concentration affects odour identity in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1579), 2417-2422.
- Zhu, K., Liu, M., Fu, Z., Zhou, Z., Kong, Y., Liang, H., Lin, Z., Luo, J., Zheng, H., Wan, P., Zhang, J., Zen, K., Chen, J., Hu, F., Zhang, C., Ren, J. y Chen, X. (2017). Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genetics*, 13(8), e1006946.

## Anexos

### Anexo A: Imágenes satelitales de los cultivos evaluados

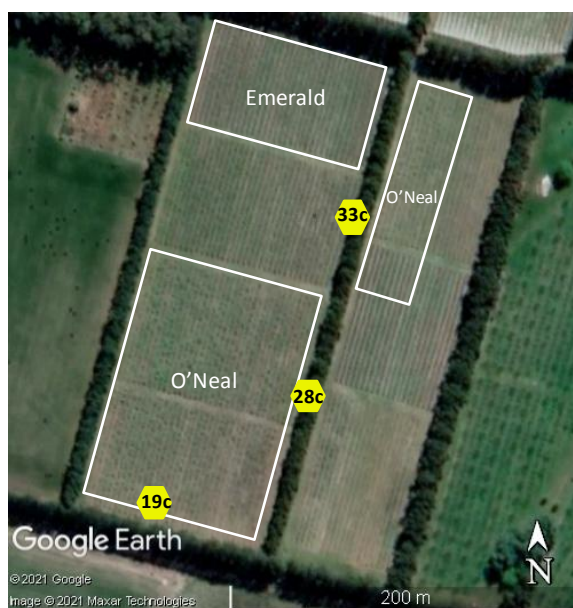


**Figura A1. Cultivo de girasol (*Helianthus annuus*) para la producción de semillas híbridas en las cercanías de Coronel Suárez (37°58'31"S, 61°35'45"O), provincia de Buenos Aires, Argentina. El recuadro blanco indica la superficie del cultivo y los hexágonos señalan la ubicación y el número de colmenas de *Apis mellifera* dispuestas en los bordes del cultivo.**





**Figura A2. Cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) bajo macrotúneles en las cercanías de Gobernador Virasoro (27°56'45"S, 56°5'30"O), provincia de Corrientes, Argentina.** Los recuadros indican las dos zonas seleccionadas con plantas de los cultivares Emerald y San Joaquín en flor durante julio 2017 y 2019. La zona 1 ocupaba una superficie de 1 ha, abarcando 108 hileras con un total de 9.576 plantas. La zona 2 ocupaba una superficie de 1,65 ha, abarcando 198 hileras con 15.636 plantas. En 2017, las colmenas de *Apis mellifera* se dispusieron por fuera del cultivo (5,6 colmenas /ha), y los nidos de *Bombus pauloensis* se encontraban bajo los macrotúneles (4 nidos /ha). En 2019, las colmenas se ubicaron bajo los macrotúneles en un extremo de las hileras (20 colmenas /ha), y en el extremo opuesto, los nidos de abejorros (6 nidos /ha).



**Figura A3. Cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) en las cercanías de San Pedro (33°47'48"S, 59°44'13"O), provincia de Buenos Aires, Argentina.** Los recuadros indican los lotes con cultivares en flor durante julio 2018. Las plantas de las áreas circundantes no se encontraban en flor al momento de realizar el estudio. Los hexágonos indican la ubicación de los grupos de colmenas dispuestas en los bordes del cultivo y el número de colmenas en cada grupo sometidas a tres tratamientos (Control, Formulado y Testigo), asignados al azar entre las colmenas de los tres grupos.





**Figura A4. Cultivos de arándano (*Vaccinium corymbosum*), cultivares Emerald, O'Neal y Misty. (A) Plantación en las cercanías de Concordia, (31°26'57"S, 58°6'8"O), provincia de Entre Ríos, Argentina. (B) Plantación en las cercanías de Parada Robles, (34°23'21"S, 59°9'22"O), provincia de Buenos Aires, Argentina. Los recuadros indican los lotes con cultivares en flor. Los hexágonos indican la ubicación de los grupos de colmenas dispuestas en los bordes del cultivo y el número de colmenas en cada grupo sometidas a dos tratamientos (Control y Formulado, representados con diferente color).**



**Figura A5. Cultivo de kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*), cultivares Hayward, Chico malo, Matua, Tomuri y Chieftain en las cercanías de Navarro (33°47'48"S, 59°44'13"O), provincia de Buenos Aires, Argentina. Los recuadros indican los lotes con cultivares en flor. Los hexágonos indican la ubicación de los grupos de colmenas dispuestas en los bordes del cultivo y el número de colmenas en cada grupo sometidas a dos tratamientos (Control y Formulado, representados con diferente color).**



**Figura A6. Cultivo de kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa*), cultivares Hayward y Matua en las cercanías de Mar del Plata (38°07'04"S, 57°43'51"O), provincia de Buenos Aires, Argentina. Los recuadros indican los dos lotes (L1 y L2) seleccionados con cultivares en flor. Las colmenas estaban dispuestas entre las hileras del cultivo en ambos lotes. Se indica con marcas verde las colmenas sometidas al tratamiento Control (N = 15 colmenas en L1 y N = 10 colmenas en L2) y con marcas naranja, al tratamiento Formulado (N = 10 colmenas en L1 y N = 15 colmenas en L2).**

## Anexo B: Tablas estadísticas

**Tabla B1. Conjunto de variables y modelos estadísticos propuestos para la caracterización de las líneas parentales macho estéril (ME) y macho fértil (MF) de un híbrido de girasol para la producción de semillas y los patrones de recolección de *Apis mellifera* y *Melissodes* spp. en dicho cultivo.** Se indica para cada modelo máximo propuesto (la estructura de error considerada), los coeficientes, errores estándares, valores z y p valor (prueba de Wald) obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita,  $p < 0,05$ ).

Sección y Modelo máximo propuesto	Coeficiente	Error estándar	valor z	p valor
<b>2.3.1 Caracterización de las líneas parentales</b>				
<i>Altura de la planta:</i>				
Modelo (Gamma(log)): Altura ~ parental				
Factores fijos:				
Intercepto	4,44	0,02	238,56	<b>&lt; 2e-16</b>
Parental (MF)	0,16	0,03	6,08	<b>1,18e-09</b>
<i>Diámetro del capítulo:</i>				
Modelo (Función de varianza <i>varIdent</i> ): Diámetro ~ parental				
Factores fijos:				
Intercepto	11,54	0,37	31,18	<b>0</b>
Parental (MF)	-4,10	0,40	-10,26	<b>0</b>
<b>2.3.2 Patrón de recolección de <i>A. mellifera</i> y abejas <i>Melissodes</i> en ambos parentales</b>				
Modelo (Poisson):				
Nro. de individuos por transecta ~ parental * visitante + (1 transecta) + offset(log(%floración))				
Factores fijos:				
Intercepto	-0,87	0,09	-9,62	<b>&lt; 2e-16</b>
Parental (MF)	-0,58	0,15	-3,91	<b>9,26e-05</b>
Visitante ( <i>Melissodes</i> spp. hembras)	-4,23	0,21	-19,70	<b>&lt; 2e-16</b>
Visitante ( <i>Melissodes</i> spp. machos)	-5,93	0,50	-11,85	<b>&lt; 2e-16</b>
Parental MF: <i>Melissodes</i> spp. hembras	5,13	0,23	21,89	<b>&lt; 2e-16</b>
Parental MF: <i>Melissodes</i> spp. machos	3,64	0,57	6,45	<b>1,13e-10</b>
<b>2.3.3 Patrón de recolección a escala individual</b>				
Modelo (Binomial negativa):				
Nro. de flores visitadas ~ parental + visitante + offset(log(duración))				
Factores fijos:				
Intercepto	-4,04	0,18	-22,95	<b>&lt; 2e-16</b>

	Parental (MF)	-0,11	0,22	-0,48	0,632
	Visitante ( <i>Melissodes</i> spp.)	1,03	0,20	5,26	<b>1,41e-07</b>
Modelo (Bernoulli):					
Recurso recolectado ~ visitante * parental + momento del día + (1 transecta)					
Factores fijos:					
	Intercepto	-6,51	0,71	-9,22	<b>&lt; 2e-16</b>
	Visitante ( <i>Melissodes</i> spp.)	5,44	0,89	6,10	<b>1,05e-09</b>
	Parental (MF)	7,11	0,80	8,94	<b>&lt; 2e-16</b>
	Momento del día (Tarde)	-1,93	0,47	-4,07	<b>4,71e-05</b>
	<i>Melissodes</i> spp. : Parental MF	-4,25	0,92	-4,62	<b>3,93e-06</b>
Modelo (Bernoulli):					
Constancia en MF ~ especie + offset(log(nro.flores))					
Factores fijos:					
	Intercepto	-3,96	0,74	-5,35	<b>8,9e-08</b>
	Visitante ( <i>Melissodes</i> spp.)	-0,80	1,26	-0,64	0,525

**Tabla B2. Conjunto de variables y modelos estadísticos propuestos para la caracterización de los cultivares de arándano y de los patrones de recolección de *Apis mellifera* y *Bombus pauloensis* en dicho cultivo.** Se indica para cada modelo máximo propuesto (la estructura de error considerada), los coeficientes, errores estándares, valores z y p valor (prueba de Wald) obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita,  $p < 0,05$ ).

Sección y Modelo máximo propuesto	Coeficiente	Error estándar	valor z	p valor	
3.3.1 Caracterización de los cultivares de arándano					
<i>Disponibilidad de néctar (nectar standing crop):</i>					
Modelo (Gaussiana): Volumen de néctar ~ cultivar					
Factores fijos:					
	Intercepto	2,90	0,25	11,72	<b>&lt; 2e-16</b>
	Cultivar (SJ)	1,09	0,37	2,94	<b>0,0033</b>
Modelo (Gaussiana): Concentración de azúcares ~ cultivar					
Factores fijos:					
	Intercepto	20,28	0,92	22,08	<b>&lt; 2e-16</b>
	Cultivar (SJ)	-1,68	1,29	-1,30	0,194
<i>Producción de néctar:</i>					
Modelo (Gaussiana): Volumen de néctar ~ cultivar + edad de la flor + (1 rama)					
Factores fijos:					
	Intercepto	0,52	0,50	1,05	0,294

	Cultivar (SJ)	2,55	0,51	4,98	<b>6,50e-07</b>
	Edad de la flor (2 días)	4,09	0,53	7,68	<b>1,65e-14</b>
	Edad de la flor (3 días)	6,88	0,56	12,31	<b>&lt; 2e-16</b>
Modelo (Gaussiana): Concentración de azúcares ~ cultivar + edad de la flor + (1 rama)					
Factores fijos:					
	Intercepto	59,08	1,91	30,96	<b>&lt; 2e-16</b>
	Cultivar (SJ)	-2,50	2,12	-1,18	0,2380
	Edad de la flor (2 días)	0,91	1,67	0,54	0,5863
	Edad de la flor (3 días)	5,93	1,64	3,62	<b>0,0003</b>
3.3.2 Patrón de recolección a escala poblacional					
Modelo <sup>#</sup> (Binomial negativa):					
Nro. de abejas por transecta ~ año * especie + cultivar + nido <i>Bombus</i> + (1 transecta)					
Factores fijos:					
	Intercepto	2,92	0,09	33,80	<b>&lt; 2e-16</b>
	Año(2019)	-0,08	0,09	-0,90	0,367
	Especie ( <i>Bombus</i> )	-3,80	0,17	-22,68	<b>&lt; 2e-16</b>
	Cultivar (SJ)	-0,61	0,09	-6,61	<b>3,82e-11</b>
	Nido <i>Bombus</i> (distante)	-0,09	0,08	-1,11	0,268
	Año 2019 : <i>Bombus</i>	1,26	0,19	6,81	<b>9,52e-12</b>
# Inicialmente el modelo incluyó la zona como factor fijo (2 niveles) y fue removido por ser no significativo (p= 0.6138).					
3.3.3 Patrón de recolección a escala individual					
Modelo (Binomial negativa):					
Nro. de flores visitadas ~ especie + cultivar + offset(log(duración))					
Factores fijos:					
	Intercepto	-2,71	0,05	-51,22	<b>&lt; 2e-16</b>
	Especie ( <i>Bombus</i> )	0,41	0,06	6,73	<b>1,75e-11</b>
	Cultivar (SJ)	-0,18	0,07	-2,76	<b>0,0057</b>
Modelo (Bernoulli):					
Recurso recolectado ~ año + cultivar * especie + momento del día + (1 transecta)					
Factores fijos:					
	Intercepto	1,67	0,29	5,73	<b>1,05e-08</b>
	Año (2019)	0,15	0,26	0,59	0,5580
	Cultivar (SJ)	0,29	0,46	0,65	0,5191
	Especie ( <i>Bombus</i> )	-0,43	0,25	-1,72	0,0857
	Momento del día (Tarde)	0,17	0,25	0,67	0,5023
	Año 2019 : <i>Bombus</i>	-1.31	0,58	-2,24	<b>0,0250</b>
Modelo (Binomial negativa):					
Nro. tétradas de polen ~ tipo de recolectora * especie					

Factores fijos:					
	Intercepto	0,11	0,36	0,31	0,7555
	Tipo de recolectora (polen)	1,35	0,49	2,77	<b>0,0057</b>
	Especie ( <i>Bombus</i> )	2,92	0,50	5,85	<b>4,91e-09</b>
	Recolectora de polen : <i>Bombus</i>	-0,68	0,71	-0,95	0,3402
Modelo (Binomial negativa):					
Nro. tétradas de polen ~ especie * región del cuerpo + (1 ID)					
Factores fijos:					
	Intercepto	-1,25	0,43	-2,89	<b>0,0039</b>
	Especie ( <i>Bombus</i> )	3,80	0,55	6,86	<b>6,68e-12</b>
	Región (Patas)	-0,07	0,55	-0,14	0,8924
	Región (Tórax-Abdomen)	0,31	0,51	0,61	0,5418
	<i>Bombus</i> : Región (Patas)	-1,15	0,70	-1,64	0,1007
	<i>Bombus</i> : Región (Tórax-Abdomen)	-2,53	0,69	-3,69	<b>0,00023</b>
Modelo (Bernoulli):					
Constancia ~ especie + cultivar + turno + offset(log(nro.flores))					
Factores fijos:					
	Intercepto	-3,71	0,44	-8,38	<b>&lt;2e-16</b>
	Especie ( <i>Bombus</i> )	-0,97	0,47	-2,06	<b>0,0396</b>
	Cultivar (SJ)	-0,12	0,50	-0,25	0,8031
	Turno (Tarde)	-0,01	0,48	-0,02	0,9836

**Tabla B3. Conjunto de variables y modelos estadísticos propuestos para el análisis del efecto de la estimulación de colmenas de *Apis mellifera* con el Formulador Arándano y con el Formulador Kiwi.** Se indica para cada modelo máximo propuesto (con la estructura de error considerada), los coeficientes, errores estándares, valores z y p valor (prueba de Wald) obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita,  $p < 0,05$ ).

Sección y Modelo máximo propuesto	Coefficiente	Error estándar	valor z	p valor	
4.3.1.3 Efecto del Formulador Arándano					
4.3.1.3.1 Actividad recolectora de las colmenas					
Modelo (Binomial negativa): Ingresos totales /min ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1   colmena)					
<u>PRE-estimulación (días -1 y 0):</u>					
Factores fijos:					
	Intercepto	2,077	0,227	9,129	<b>&lt; 2e-16</b>
	Día (día0)	0,068	0,129	0,525	0,5993
	Turno (Tarde)	0,061	0,131	0,467	0,6405
	Tratamiento (Control)	0,034	0,216	0,160	0,8729
	Tratamiento (Formulado)	0,461	0,214	2,152	<b>0,0314</b>
	Grupo (G2)	-0,170	0,231	-0,738	0,4608
	Grupo (G3)	-0,114	0,220	-0,516	0,6056
<u>POST-estimulación (días 1, 2 y 3):</u>					
Factores fijos:					

Intercepto	2,335	0,190	12,276	<b>&lt; 2e-16</b>
Día (día2)	-0,179	0,070	-2,566	<b>0,0103</b>
Día (día3)	0,270	0,068	3,951	<b>7,79 e-05</b>
Turno (tarde)	0,374	0,056	6,620	<b>3,58e-11</b>
Tratamiento (Control)	0,075	0,183	0,409	0,6827
Tratamiento (Formulado)	0,327	0,183	1,787	0,0739
Grupo (G2)	0,077	0,198	0,390	0,6964
Grupo (G3)	0,350	0,189	1,852	0,0640

PRE-estimulación (días -1 y 0):

Modelo (Poisson): Ingresos con polen /min ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena)

Factores fijos:

Intercepto	0,427	0,379	1,129	0,2589
Día (día0)	-0,194	0,089	-2,173	<b>0,0298</b>
Turno (Tarde)	-0,968	0,126	-7,685	<b>1,53e-14</b>
Tratamiento (Control)	0,514	0,371	1,385	0,1660
Tratamiento (Formulado)	0,771	0,369	2,090	<b>0,0367</b>
Grupo (G2)	0,030	0,399	0,075	0,9405
Grupo (G3)	0,314	0,378	0,831	0,4060

POST-estimulación (días 1, 2 y 3):

Factores fijos:

Intercepto	0,497	0,335	1,486	0,1373
Día (día2)	-0,038	0,060	-0,633	0,5269
Día (día3)	0,427	0,054	7,872	<b>3,49e-15</b>
Turno (tarde)	-0,268	0,046	-5,876	<b>4,20e-09</b>
Tratamiento (Control)	0,662	0,331	2,001	<b>0,04543</b>
Tratamiento (Formulado)	0,985	0,330	2,990	<b>0,00279</b>
Grupo (G2)	-0,100	0,357	-0,279	0,7801
Grupo (G3)	0,407	0,337	1,209	0,2266

PRE-estimulación (días -1 y 0):

Modelo (Poisson): Ingresos con polen de arándano /min ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena)

Factores fijos:

Intercepto	-0,264	0,431	-0,612	0,541
Día (día0)	-0,686	0,143	-4,815	<b>1,47e-06</b>
Turno (Tarde)	-0,014	0,165	-0,082	0,934
Tratamiento (Control)	0,316	0,409	0,773	0,439
Tratamiento (Formulado)	0,648	0,403	1,608	0,108
Grupo (G2)	0,097	0,446	0,217	0,828
Grupo (G3)	0,592	0,416	1,424	0,154

POST-estimulación (días 1, 2 y 3):

Modelo (Binomial Negativa): Ingresos con polen de arándano /min ~ día + turno + tratamiento + grupo + (1 | colmena)

Factores fijos:					
	Intercepto	-0,470	0,338	-1,392	0,1639
	Día (día2)	-0,026	0,136	-0,190	0,8493
	Día (día3)	0,235	0,133	1,765	0,0775
	Turno (tarde)	0,477	0,111	4,292	<b>1,77e-05</b>
	Tratamiento (Control)	0,430	0,315	1,364	0,1727
	Tratamiento (Formulado)	0,713	0,313	2,279	<b>0,0227</b>
	Grupo (G2)	-0,014	0,341	-0,042	0,9666
	Grupo (G3)	0,528	0,320	1,650	0,0990
<b>4.3.1.3.2 Desarrollo del área de cría y de reserva de las colmenas</b>					
Modelo (Gaussiana): Delta área de cría abierta ~ grupo + tratamiento + área inicial					
Factores fijos:					
	Intercepto	175,99	199,88	0,880	0,390
	Grupo (G2)	315,15	197,35	1,597	0,128
	Grupo (G3)	143,31	197,36	0,726	0,477
	Tratamiento (Control)	234,03	189,23	1,237	0,232
	Tratamiento (Formulado)	335,16	200,78	1,669	0,112
	área inicial	-0,41	0,34	-1,217	0,239
Modelo (Gaussiana): Delta área de reserva ~ grupo + tratamiento + área inicial					
Factores fijos:					
	Intercepto	436,51	383,92	1,137	0,2704
	Grupo (G2)	416,70	400,47	1,041	0,3119
	Grupo (G3)	135,17	411,30	0,329	0,7462
	Tratamiento (Control)	130,93	340,74	0,384	0,7053
	Tratamiento (Formulado)	120,45	330,50	0,364	0,7198
	área inicial	-0,18	0,10	-1,796	0,0893
<b>4.3.1.4 Rendimiento del cultivo</b>					
<u>Sitio Concordia:</u>					
Modelo (binomial, OLRE): Nro. frutos / nro. flores ~ tratamiento + (1 planta) + (1 ID)					
Factores fijos:					
	Intercepto	0,499	0,139	3,592	<b>3,28e-04</b>
	Tratamiento (Formulado)	0,210	0,195	1,079	0,2805
<u>Sitio Parada Robles:</u>					
Modelo (binomial, inflada en ceros): Nro. frutos / nro. flores ~ tratamiento + cultivar + (1 planta) + (1 ID)					
Factores fijos:					
	Intercepto	0,124	0,424	0,291	0,7707
	Tratamiento (Formulado)	0,459	0,460	1,000	0,3196
	Cultivar (O'Neal)	0,764	0,458	1,667	0,0955
<b>4.3.2.4 Efecto del Formulado Kiwi</b>					
<b>4.3.2.4.1 Actividad recolectora de las colmenas</b>					
Modelo (Binomial negativa): Ingresos totales /min ~ día.turno + tratamiento + ingreso + (1   colmena)					



<u>PRE-estimulación (días 0 mañana y tarde):</u>					
Factores fijos:					
	Intercepto	2,991	0,146	20,428	<b>&lt; 2e-16</b>
	Día.turno (día0.Tarde)	0,432	0,145	2,989	<b>0,0028</b>
	Tratamiento (Formulado)	0,232	0,150	1,550	0,1212
	ingreso (8NOV)	-0,7623	0,153	-4,993	<b>5,95e-07</b>
<u>POST-estimulación (días 2 y 8, sólo ingreso 8NOV):</u>					
Modelo (Binomial negativa): Ingresos totales /min ~ día.turno + tratamiento + (1   colmena)					
Factores fijos:					
	Intercepto	2,627	0,240	10,941	<b>&lt; 2e-16</b>
	Día (día2.Tarde)	-0,119	0,150	-0,790	0,429
	Día (día8.Mañana)	-0,159	0,152	-1,047	0,295
	Día (día8.Tarde)	0,203	0,150	1,354	0,176
	Tratamiento (Formulado)	0,382	0,284	1,348	0,178
4.3.2.4.2 <i>Actividad recolectora de polen (trampas de polen)</i>					
Modelo (Gaussiana): Peso seco ~ tratamiento					
<u>PRE-estimulación (día 0):</u>					
Factores fijos:					
	Intercepto	0,047	0,016	2,858	<b>0,0043</b>
	Tratamiento (Formulado)	0,012	0,023	0,528	0,5972
<u>POST-estimulación (días 2 y 8):</u>					
Modelo (Gaussiana): Modelo (Gaussiana): Peso seco ~ tratamiento + día + (1   colmena)					
Factores fijos:					
	Intercepto	0,023	0,012	1,858	0,0632
	Tratamiento (Formulado)	0,027	0,014	1,846	0,0649
	Día (día8)	0,022	0,014	1,556	0,1197
Modelo (Binomial negativa): Nro. cargas ~ tratamiento					
<u>PRE-estimulación (día 0):</u>					
Factores fijos:					
	Intercepto	2,752	0,435	6,324	<b>2,54e-10</b>
	Tratamiento (Formulado)	0,202	0,614	0,329	0,742
<u>POST-estimulación (días 2 y 8):</u>					
Modelo (Conway Maxwell Poisson): Nro. cargas ~ tratamiento + día + (1   colmena)					
Factores fijos:					
	Intercepto	2,009	0,267	7,532	<b>5,01e-14</b>
	Tratamiento (Formulado)	0,570	0,300	1,903	0,057
	Día (día8)	-0,135	0,296	-0,458	0,647
4.3.2.4.3 <i>Desarrollo del área de cría y de reserva de las colmenas</i>					

Modelo (Gaussiana): Delta área de cría abierta ~ tratamiento + área inicial					
Factores fijos:					
	Intercepto	374,66	746,78	0,502	0,622
	Tratamiento (Formulado)	678,63	450,61	1,506	0,150
	área inicial	-0,21	0,42	-0,505	0,620
Modelo (Gaussiana): Delta área de polen ~ tratamiento + área inicial					
Factores fijos:					
	Intercepto	230,92	100,94	2,288	<b>0,0352</b>
	Tratamiento (Formulado)	49,64	127,58	0,389	0,7021
	área inicial	0,46	0,51	0,905	0,3782
<b>4.3.2.5 Rendimiento del cultivo</b>					
Modelo (binomial): Nro. frutos / nro. flores ~ tratamiento + lote					
Factores fijos:					
	Intercepto	0,601	0,209	2,868	<b>0,004132</b>
	Tratamiento (Formulado)	1,035	0,280	3,692	<b>0,000222</b>
	Lote (LoteA2)	-0,397	0,274	-1,447	0,1479

**Tabla B4. Conjunto de variables y modelos estadísticos propuestos para el análisis de los condicionamientos olfativos en el desarrollo del Formulado Kiwi.** Se indica para cada modelo máximo propuesto (con la estructura de error considerada), los coeficientes, errores estándares, valores z y p valor (prueba de Wald) obtenidos en la salida de cada modelo (en negrita,  $p < 0,05$ ).

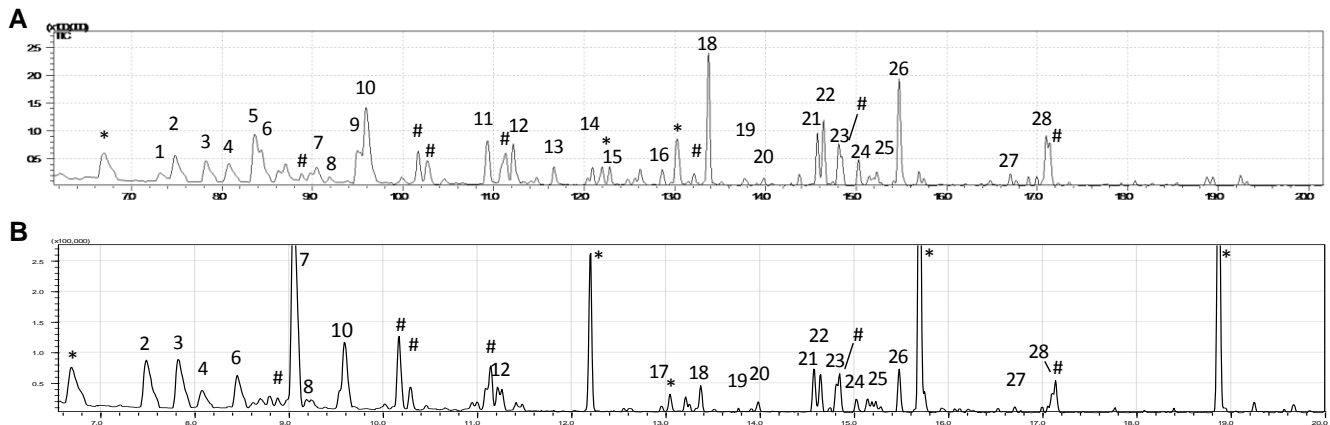
Sección y Modelo máximo propuesto	Coeficiente	Error estándar	valor z	p valor	
<b>4.3.2.2 Condicionamientos olfativos absolutos</b>					
Modelo (Bernoulli): Respuesta ~ EC (mezcla sintética) + olor floral + (1   abeja)					
Factores fijos:					
	Intercepto	-1,877	0,457	-4,111	<b>3,94e-05</b>
	EC (mezclaII)	-0,855	0,662	-1,292	0,1965
	EC (mezclaIII)	-0,247	0,610	-0,404	0,6859
	EC (mezclaIV)	0,990	0,630	1,572	0,1160
	EC (mezclaV)	1,809	0,634	2,851	<b>0,00436</b>
	EC (mezclaVI)	1,188	0,591	2,011	<b>0,04437</b>
	Olor floral (flores masculinas)	-0,068	0,261	-0,261	0,7941
<b>4.3.2.3 Condicionamientos olfativos diferenciales</b>					
Modelo (Bernoulli): ID ~ serie (EC+EC-) + par de ensayos + (1   abeja)					
<u>EC+ mezclas sintéticas y EC- extractos florales</u>					

Factores fijos:	-2,343	0,572	-4,095	<b>4,22e-05</b>
Intercepto	0,116	0,667	0,173	0,8624
Mezcla II (EC+) Flor Masc. (EC-)	-2,499	0,779	-3,210	<b>0, 0013</b>
Mezcla V (EC+) Flor Fem. (EC-)	-1,730	0,739	-2,342	<b>0,0192</b>
Mezcla V (EC+) Flor Masc. (EC-)	-0,053	0,656	-0,081	0,9353
Mezcla V (EC+) Jazmín (EC-)	1,828	0,401	4,565	<b>4,99e-06</b>
Ensayo 3	2,074	0,408	5,078	<b>3,81e-07</b>
Ensayo 4				
<u>EC+ extractos florales y EC- mezclas sintéticas</u>				
Factores fijos:				
Intercepto	-3,213	0,608	-5,288	<b>1,24e-07</b>
Flor Fem. (EC+) Mezcla V (EC-)	-0,649	0,675	-0,962	0,336
Flor Masc. (EC+) Mezcla II (EC-)	0,539	0,613	0,878	0,380
Flor Masc. (EC+) Mezcla V (EC-)	-0,200	0,611	-0,328	0,743
Jazmín (EC+) Mezcla V (EC-)	-0,135	0,632	-0,213	0,831
Ensayo 3	1,764	0,422	4,178	<b>2,94e-05</b>
Ensayo 4	2,335	0,438	5,338	<b>9,40e-08</b>

## Anexo C: Tablas y figuras suplementarias

**Tabla C1. Visitantes florales diurnos de un híbrido aceitero de girasol (*Helianthus annuus*).** Diversidad y abundancia e identidad de los visitantes relevados en 100 unidades florales (UF) abiertas a lo largo de 48 transectas en líneas parentales macho estéril y 47 transectas en líneas macho fértil.

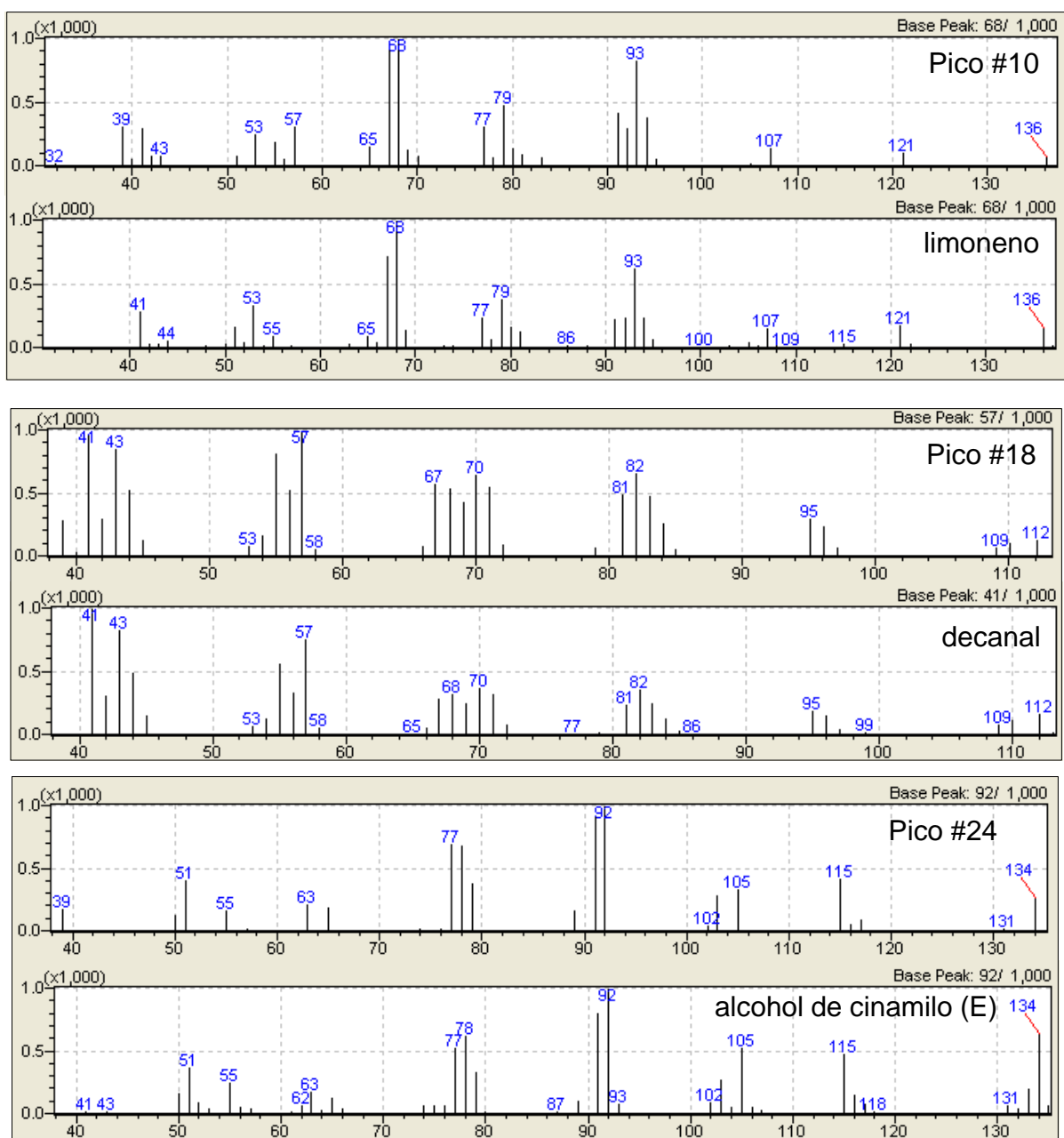
Orden	Familia	Género	Especie	Línea Marcho Estéril		Línea Marcho Fértil	
				Total de individuos /100 UF abiertas	Media de individuos /100 UF abiertas	Total de individuos /100 UF abiertas	Media de individuos /100 UF abiertas
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis</i>	<i>Apis mellifera</i>	1512	31,5	158	3,4
		<i>Melissodes</i>	<i>Melissodes tintinnans</i> <i>Melissodes rufithorax</i>	26 (4 machos)	0,5	406 (16 machos)	8,6
		Otra		2	0	9	
Coleoptera	Cantharidae	<i>Chauliognathus</i>	<i>Chauliognathus</i> sp.	82	1,7	137	2,9
	Otra			15	0,3	10	0,2
Diptera				27	0,6	22	
Orthoptera				69	1,4	8	0,2
Hemiptera				3	0,1	22	0,5
Neuroptera	Mantispidae			0	0	3	0,1
Lepidoptera				4	0,1	0	0
<b>TOTAL</b>				<b>1740</b>	<b>36,3</b>	<b>775</b>	<b>16,1</b>



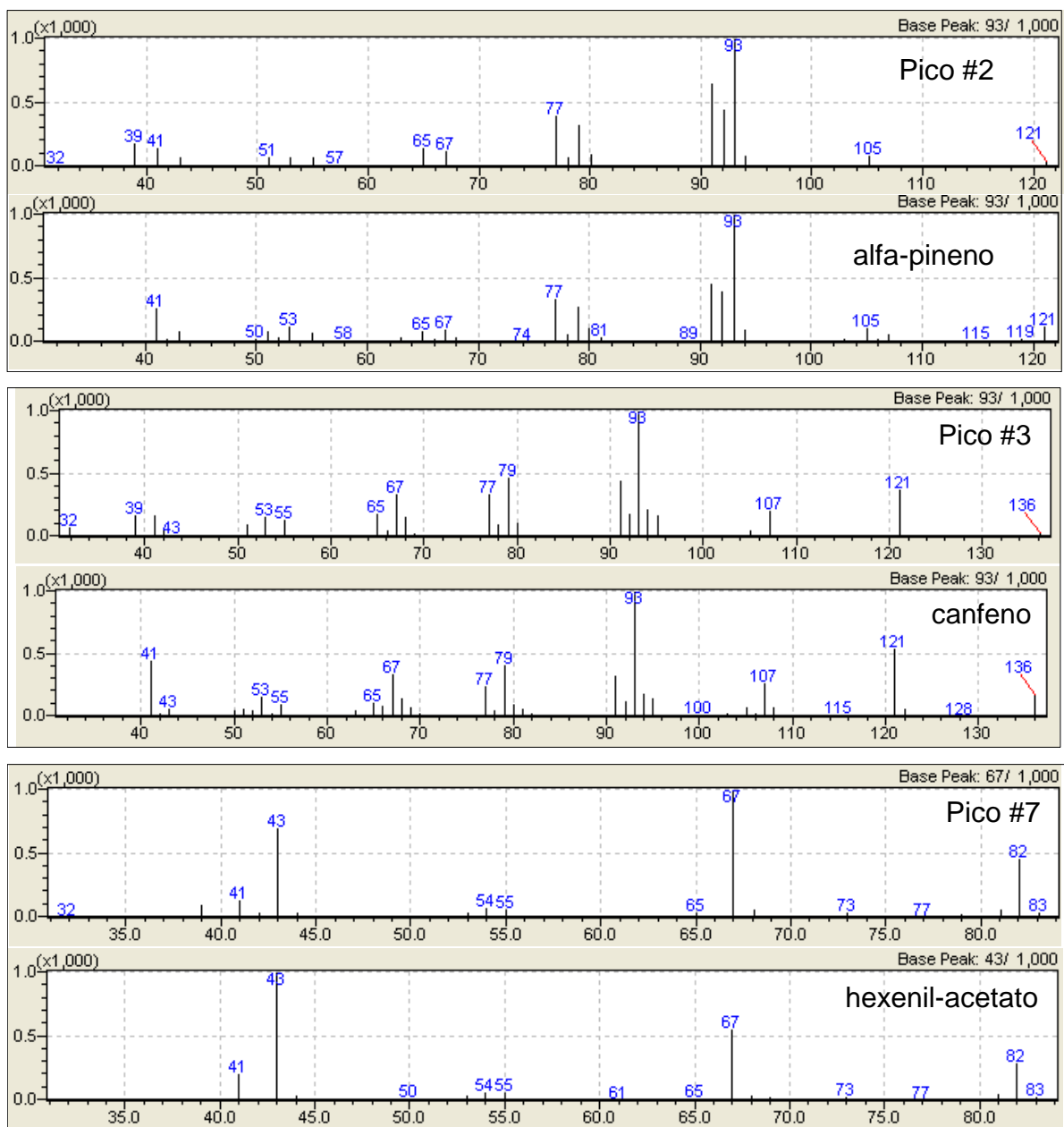
**Figura C1. Perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles presentes en flores de arándano, *Vaccinium corymbosum*, cultivares San Joaquín (A) y Emerald (B).** Cromatogramas de corriente iónica total (TIC), en los que se representa la intensidad de los iones (en unidades arbitrarias) en función del tiempo de retención (en minutos). Los números de los picos corresponden a los compuestos listados en la Tabla C2. (\*, contaminante; #, alcano de cadena larga). Las muestras fueron colectadas en una plantación de Gobernador Virasoro, provincia de Corrientes (2017).

**Tabla C2. Compuestos volátiles identificados en flores de arándano *Vaccinium corymbosum*, cultivares San Joaquín y Emerald.** El índice de similitud corresponde al porcentaje de similitud con la base de datos según biblioteca mencionada. Se indican en negrita los compuestos mayoritarios (mayor porcentaje de área relativa, respecto del área total de picos sin considerar los contaminantes). En total se identificaron 28 compuestos, los cuales representan el 71% y 68% del área total de picos de los cultivares San Joaquín y Emerald, respectivamente. (TR, tiempo de retención).

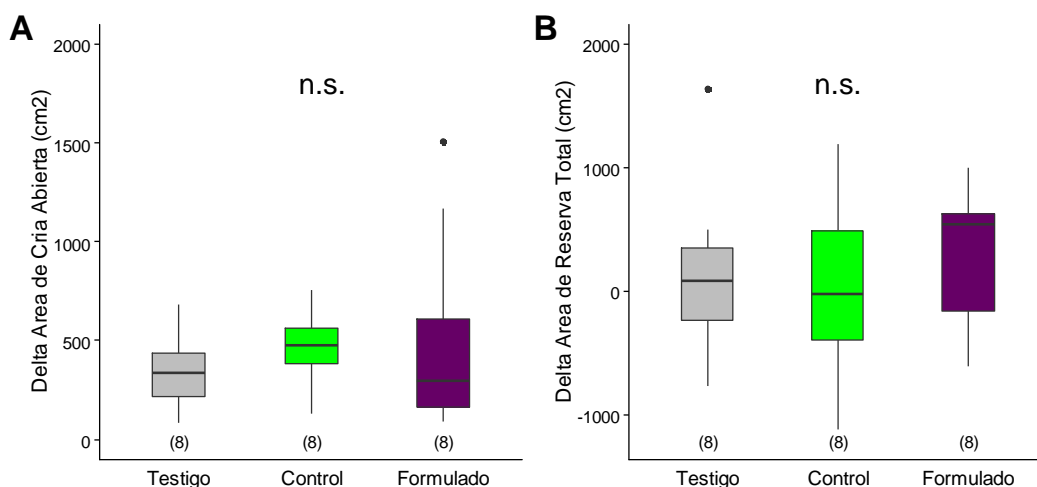
PICO	TR	Compuesto identificado	TIPO	Grupo según		Biblioteca	Índice de Similitud	SAN JOAQUIN	EMERALD
				Knudsen <i>et al.</i> 1993				AREA %	AREA %
1	7.32	alfa-felandreno / tujeno	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	81	1.11%	
2	7.47	<b>alfa-pineno</b>	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	87	3.71%	<b>7.07%</b>
3	7.79	<b>canfeno</b>	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	86	2.76%	<b>7.11%</b>
4	8.05	benzaldehído	bencenoide	bencenoide		SHIM2205	86	2.54%	2.55%
5	8.35	alfa-felandreno / tujeno/sabineno	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	85	4.91%	
6	8.45	sabineno / beta-pineno	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	85	3.13%	3.93%
7	9.05	<b>hexenil acetato</b>	éster	derivado de ácido graso		SHIM2205	78	1.45%	<b>23.64%</b>
8	9.18	careno	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	74	0.51%	0.72%
9	9.50	cimeno (p/o)	alquilbenceno	isoprenoide		SHIM2205	83	3.78%	
10	9.59	<b>limoneno</b>	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	86	<b>8.65%</b>	<b>7.58%</b>
11	10.92	terpinoleno / careno	monoterpeno	isoprenoide		SHIM2205	81	3.22%	
12	11.21	nonanal	aldehído	derivado de ácido graso		SHIM2205	87	2.92%	1.52%
13	11.66	5-metil-2(5H)-furanona	lactona	derivado de ácido graso		NIST05	85	1.05%	
14	12.09	lilac alcohol A/C	alcohol	isoprenoide		NIST05	76	0.91%	
15	12.28	lilac alcohol A/C // lilac aldehído	alcohol	isoprenoide		NIST05	77	0.95%	
16	12.86	3-metil-1-hexin-3-ol	alcohol	derivado de ácido graso		NIST05	75	0.92%	
17	12.94	Hexenil isobutanoato	éster	derivado de ácido graso		SHIM2205	90		0.31%
18	13.38	<b>decanal</b>	aldehído	derivado de ácido graso		SHIM2205	89	<b>7.22%</b>	1.43%
19	13.77	cinamaldehído E/Z	aldehído	fenilpropanoide		SHIM2205	82	0.59%	0.11%
20	13.97	hexenil propionato / hexenil valerato	éster	derivado de ácido graso		SHIM2205	76	0.44%	0.56%
21	14.55	alcohol de cinamilo E o Z	alcohol	fenilpropanoide		SHIM2205	90	2.97%	2.42%
22	14.64	dimetil-acetofenona / etil-acetofenona	cetona	bencenoide		SHIM2205	84	3.46%	1.96%
23	14.81	cinamaldehído E/Z	aldehído	fenilpropanoide		SHIM2205	93	2.41%	1.64%
24	15.02	dimetil-acetofenona / etil-acetofenona	cetona	bencenoide		SHIM2205	70	1.48%	0.89%
25	15.13	decanona / octanona	cetona	derivado de ácido graso		NIST05	83	0.57%	0.90%
26	15.47	<b>alcohol de cinamilo E o Z</b>	alcohol	fenilpropanoide		SHIM2205	86	<b>6.24%</b>	2.55%
27	16.70	hidrocinnamil acetato	éster	fenilpropanoide		SHIM2205	79	0.65%	0.29%
28	17.09	burboneno (beta o alfa)	sesquiterpeno	isoprenoide		SHIM2205	79	2.86%	1.24%
<b>TOTAL</b>								<b>71.4%</b>	<b>68.4%</b>



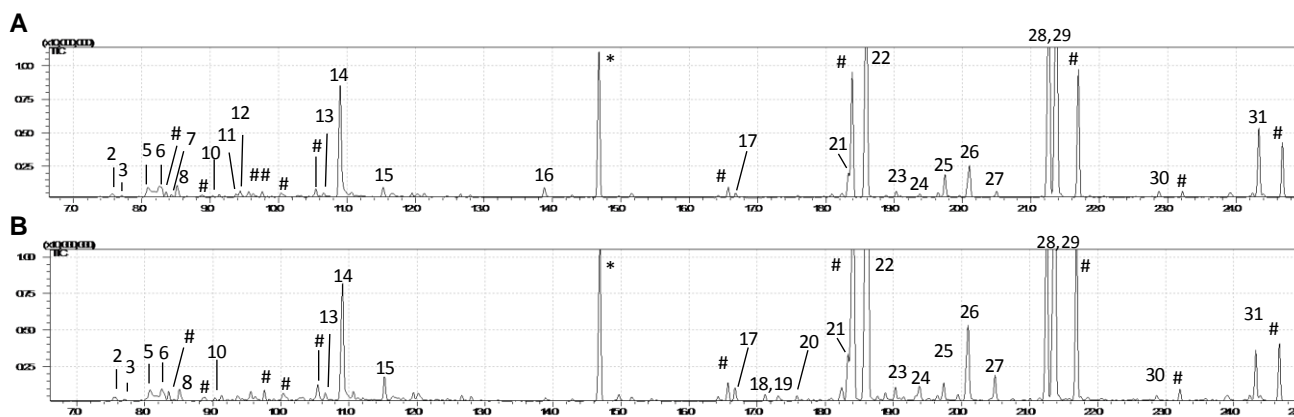
**Figura C2.** Espectros de masa de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en flores de arándano *Vaccinium corymbosum*, cultivar San Joaquín y su identificación (ver Tabla C2). En el eje horizontal se representa la relación masa/carga de los iones y en el vertical su abundancia relativa.



**Figura C3.** Espectros de masa de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en flores de arándano *Vaccinium corymbosum*, cultivar Emerald y su identificación (ver Tabla C2). En el eje horizontal se representa la relación masa/carga de los iones y en el vertical su abundancia relativa.



**Figura C4. Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas estimuladas con solución azucarada aromatizada con Formulado Arándano (Formulado), con solución azucarada sin aromatizar (Control) y sin estimular (Testigo), evaluada 11 días post-estimulación. (A) Delta del área de cría abierta (área final – área inicial). (B) Delta del área de reserva de polen y miel (área final – área inicial). Diagramas de caja donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. El número de colmenas evaluadas para cada tratamiento se indica entre paréntesis. No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo del área de cría abierta y de reservas en el período evaluado. El p valor corresponde a diferencias entre tratamientos (n.s.:  $p > 0,05$ ).**

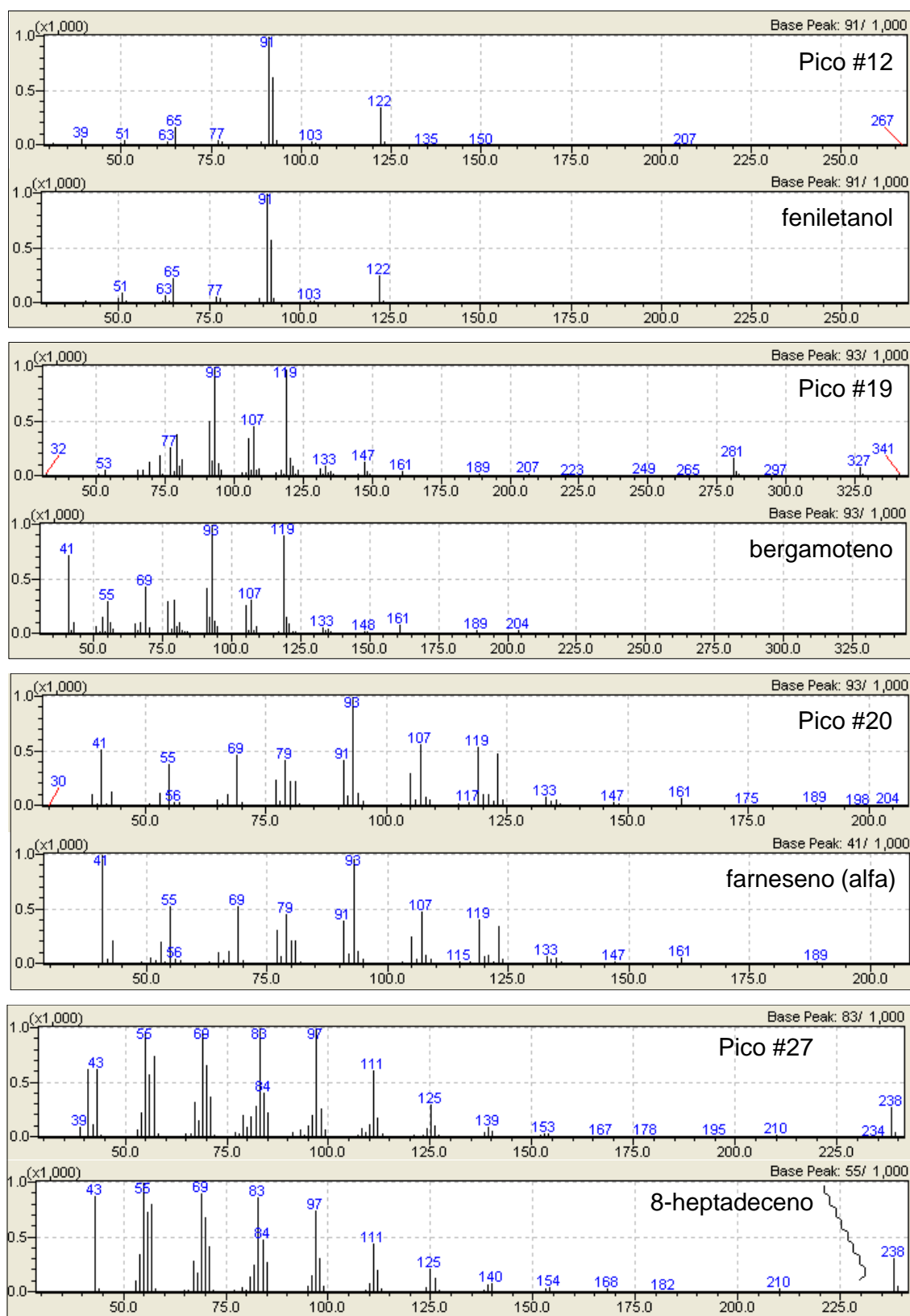


**Figura C5. Perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles presentes en flores de kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, cultivar femenino Hayward (A) y un cultivar masculino dador de polen (B). Cromatogramas de corriente iónica total (TIC), en los que se representa la intensidad de los iones (en unidades arbitrarias) en función del tiempo de retención (en minutos). Los números de los picos corresponden a los compuestos listados en la Tabla C3. (\*, contaminante; #, alcano de cadena larga). Las muestras fueron colectadas en una plantación de Miramar, provincia de Buenos Aires (2018).**

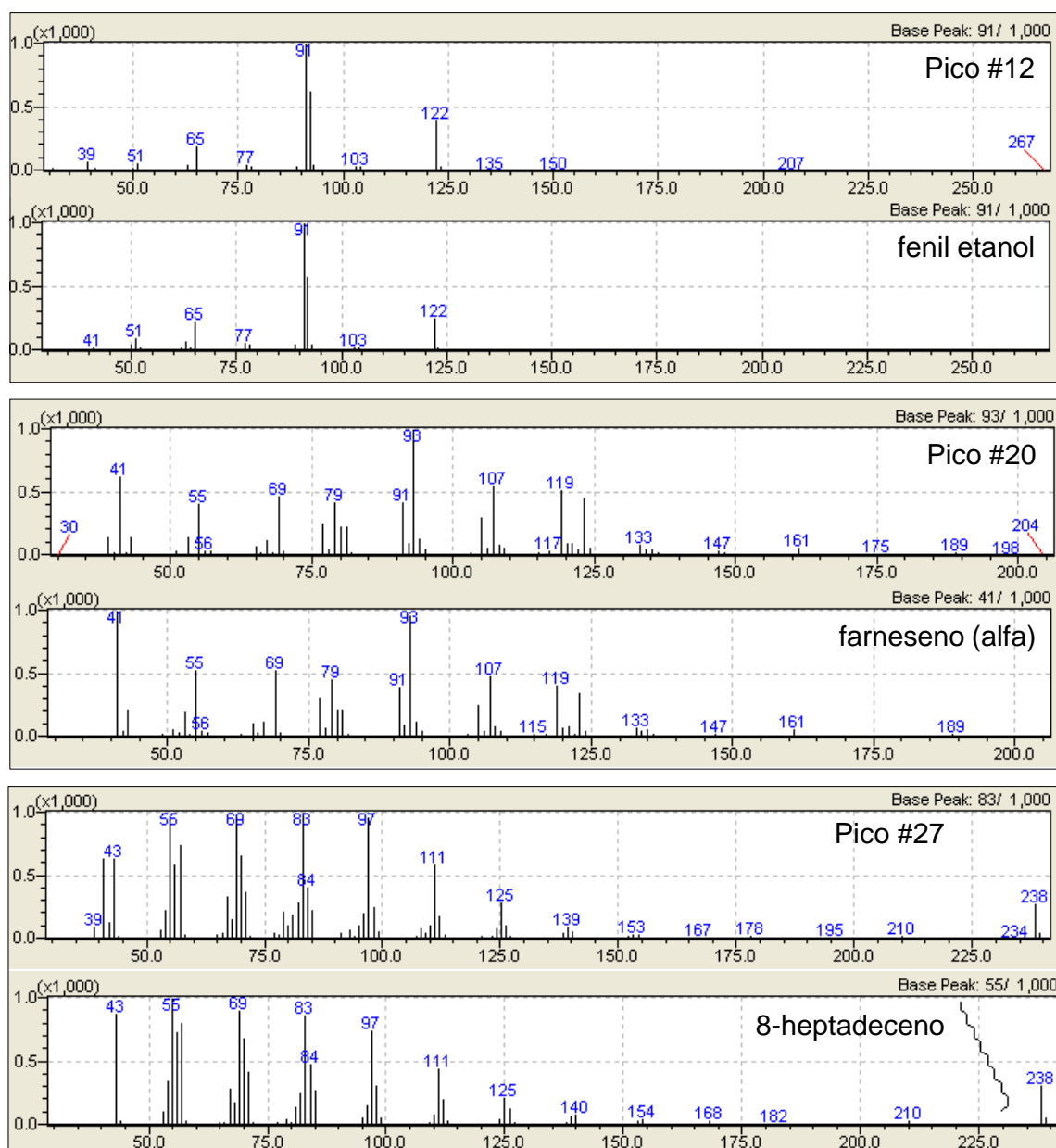


**Tabla C3 Compuestos volátiles identificados en flores de kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, cultivar femenino Hayward y un cultivar masculino.** El índice de similitud corresponde al porcentaje de similitud según con la base de datos según biblioteca mencionada. Se indican en negrita los compuestos mayoritarios (mayor porcentaje de área relativa). En total se identificaron 31 compuestos, que representan el 75% y 60% del área total de picos del cultivar Hayward y su polinizador, respectivamente (TR, tiempo de retención).

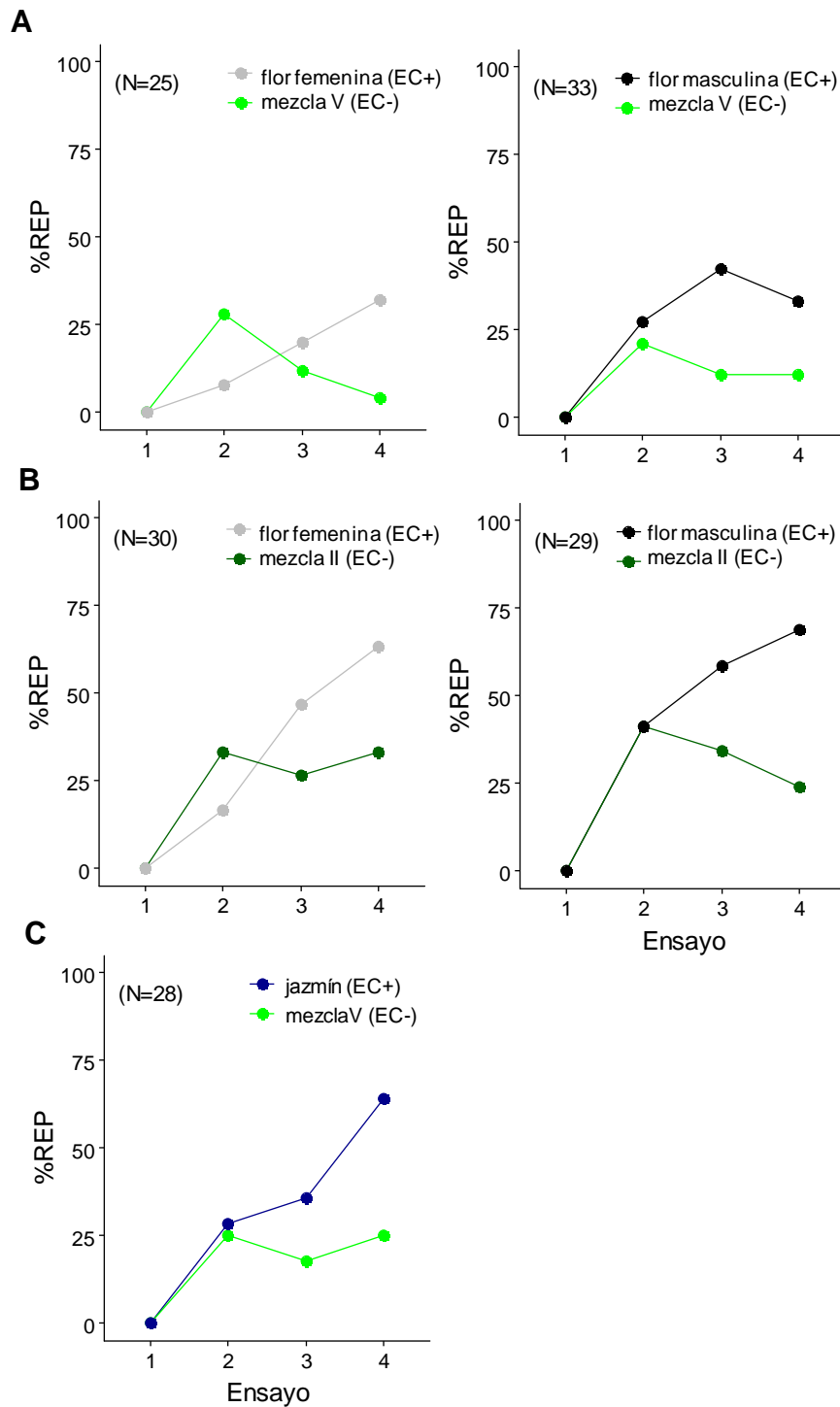
PICO	TR	Compuesto	TIPO	Grupo según <i>Knudsen et al., 1993</i>	Biblioteca	Indice de Similitud	Hayward AREA %	Polinizador AREA %
1	6.96	alfa-pineno	monoterpeno	isoprenoide	SHIM2205	82	0.02%	0.03%
2	7.54	cumeno	monoterpeno	isoprenoide	SHIM2205	91	0.34%	0.30%
3	7.68	psi-cumeno	monoterpeno	isoprenoide	SHIM2205	85	0.19%	0.13%
4	7.8	sabineno	monoterpeno	isoprenoide	SHIM2205	94	0.04%	0.04%
5	8.08	6-metil-5-hepten-2-ona	terpeno irregular	isoprenoide	SHIM2205	90	1.03%	0.89%
6	8.25	1,2,4-trimetil benceno	bencenoide	bencenoide	SHIM2205	93	1.21%	0.81%
7	8.42	octanal	aldehido	derivado de ácidos grasos	SHIM2205	78	0.18%	0.10%
8	8.51	hexenil acetato (cis/trans)	éster	derivado de ácidos grasos	SHIM2205	85	0.74%	0.60%
9	8.65	hexil acetato	éster	derivado de ácidos grasos	SHIM2205	89	0.08%	0.02%
10	9.03	limoneno	monoterpeno	isoprenoide	NIST05	76	0.10%	0.14%
11	9.36	fenil-acetaldehido	bencenoide	bencenoide	SHIM2205	90	0.23%	0.27%
12	9.43	ocimeno / careno	monoterpeno	isoprenoide	SHIM2205	90	0.38%	0.10%
13	10.65	nonanal	aldehido	derivado de ácidos grasos	SHIM2205	86	0.27%	0.35%
14	10.89	<b>2-feniletanol</b>	bencenoide	bencenoide	SHIM2205	94	<b>7.22%</b>	<b>5.47%</b>
15	11.50	oxoisoforona	cetona	derivado de ácidos grasos	NIST05	90	0.63%	0.94%
16	13.87	fenil-etil acetato	bencenoide	bencenoide	SHIM2205	92	0.60%	0.17%
17	16.68	jazmona E o Z	cetona	derivado de ácidos grasos	SHIM2205	88	0.26%	0.55%
18	17.11	ylangeno / copaeno / amorfeno / germacreno D	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	88	0.08%	0.26%
19	17.30	ylangeno / copaeno / amorfeno	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	88	0.08%	0.31%
20	17.58	neril acetona	terpeno	isoprenoide	SHIM2205	88	0.12%	0.19%
21	18.33	<b>bergamoteno</b>	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	80	<b>7.78%</b>	0.88%
22	18.57	<b>farneseno (alfa)</b>	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	93	<b>15.41%</b>	<b>19.03%</b>
23	19.03	farnesol	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	85	0.30%	0.43%
24	19.38	bulnesol /bulneseno	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	87	0.25%	0.60%
25	19.74	nonadeceno/pentadecanol		derivado de ácidos grasos	NIST05	93	1.17%	0.63%
26	20.08	bisaboleno (gamma)	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	81	2.15%	3.57%
27	20.50	bisaboleno / prenyl limoneno / pachuleno	sesquiterpeno	isoprenoide	SHIM2205	84	0.48%	1.14%
28	21.25	naftaleno / <b>heptadecadieno</b>	alqueno	derivado de ácidos grasos	SHIM2205	86	<b>13.32%</b>	<b>7.51%</b>
29	21.36	<b>8-heptadeceno</b>	alqueno	derivado de ácidos grasos	NIST05	90	<b>16.87%</b>	<b>12.96%</b>
30	22.88	1-nonadeceno / 9-tricoseno	alqueno	derivado de ácidos grasos	NIST05	93	0.49%	0.29%
31	24.32	eicoseno / docoseno	alqueno	derivado de ácidos grasos	SHIM2205	90	3.66%	1.75%
<b>TOTAL</b>							<b>75.6%</b>	<b>60.4%</b>



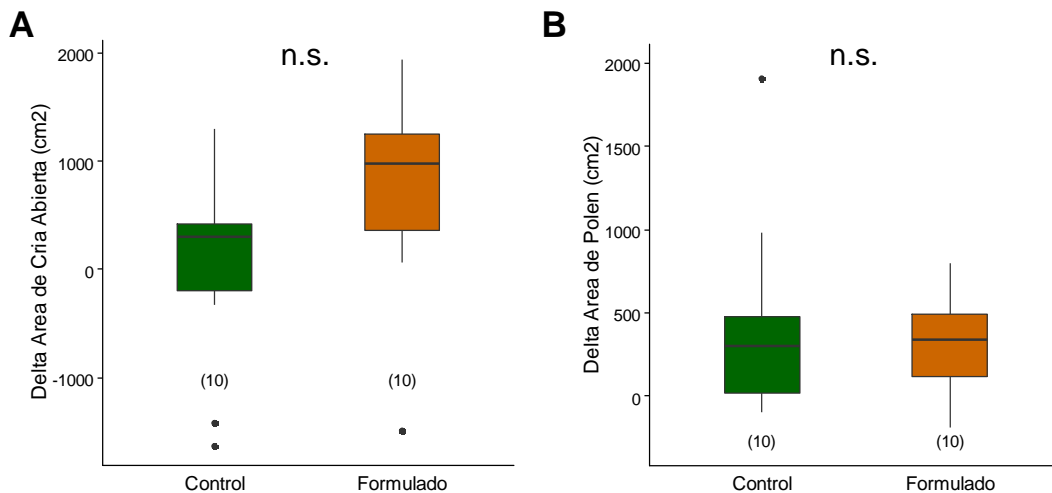
**Figura C6.** Espectros de masa de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en flores de kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, cultivar Hayward y su identificación (ver Tabla C3). En el eje horizontal se representa la relación masa/carga de los iones y en el vertical su abundancia relativa.



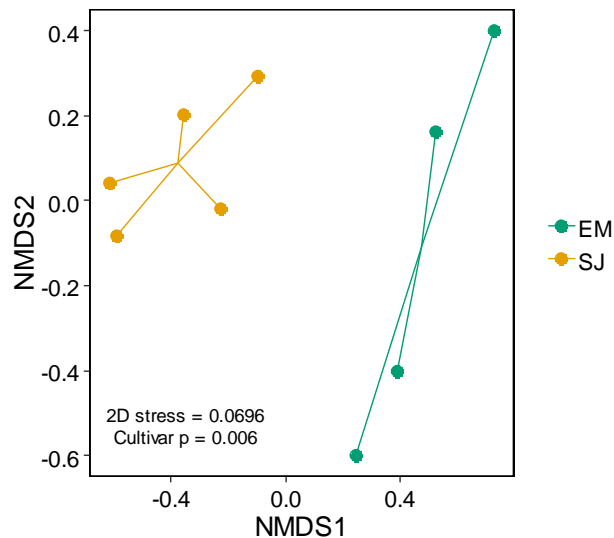
**Figura C7.** Espectros de masa de los compuestos volátiles mayoritarios presentes en flores de kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, cultivar polinizador y su identificación (ver Tabla C3). En el eje horizontal se representa la relación masa/carga de los iones y en el vertical su abundancia relativa.



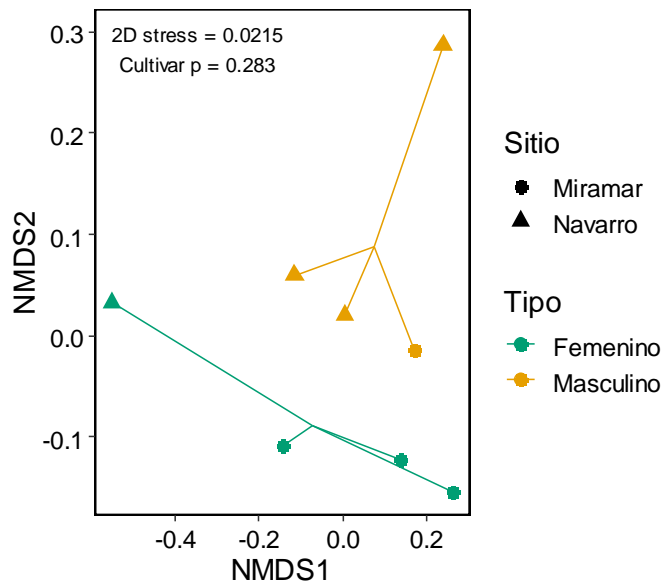
**Figura C8. Memorias olfativas y discriminación entre mezclas sintéticas y fragancias de flores de kiwi.** Porcentaje de respuesta de extensión de probóscide (%REP) en condicionamientos olfativos diferenciales. Durante los cuatro ensayos de la fase de entrenamiento, se presentaron extractos de flores femeninas o bien masculinas como estímulo condicionado recompensado (EC+), y la mezcla V (A) o bien la mezcla II (B) como estímulo condicionado no recompensado (EC-). En (C) se presentó un extracto de jazmín sintético como EC+ y la mezcla V como EC-. Se indica el número de abejas evaluadas en cada serie entre paréntesis.



**Figura C9. Desarrollo del área de cría y de reserva de colmenas estimuladas con solución azucarada aromatizada con Formulado Kiwi (Formulado) y con solución azucarada sin aromatizar (Control), evaluada 8 días post-estimulación. (A) Delta del área de cría abierta (área final – área inicial). Se observó un incremento en el área de cría abierta de las colmenas tratadas con Formulado, aunque dichas diferencias no fueron significativas. (B) Delta del área de reserva de polen (área final – área inicial). El número de colmenas evaluadas para cada tratamiento se indica entre paréntesis. No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo del área de polen en el período evaluado. Diagramas de caja donde la línea central, la caja, los bigotes y los puntos simbolizan la mediana, el rango intercuartil, el rango de datos y los valores atípicos, respectivamente. El p valor corresponde a diferencias entre tratamientos (n.s.:  $p > 0,05$ ).**



**Figura C10. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para la evaluación de las diferencias en la composición de volátiles florales de los cultivares Emerald (EM) y San Joaquín (SJ) de arándano *Vaccinium corymbosum*. Las colectas de volátiles se realizaron en Gdor. Virasoro, provincia de Corrientes durante julio de 2017. El valor de estrés (0,0696) indica que el resultado es una buena representación de las distancias en la matriz de distancias original. Ambos cultivares evaluados difirieron significativamente en su composición de volátiles florales (PERMANOVA,  $p = 0,006$ ).**



**Figura C11. Análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para la evaluación de las diferencias en la composición de volátiles florales de plantas femeninas y masculinas de kiwi *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*.** Las colectas de volátiles se realizaron en dos sitios de la provincia de Buenos Aires (Miramar y Navarro) durante noviembre de 2018. El valor de estrés (0,0215) indica que el resultado es una buena representación de las distancias en la matriz de distancias original. Ambos tipos de flores no difirieron significativamente en su composición de volátiles florales (PERMANOVA,  $p = 0,283$ ).

## Anexo D: Métodos suplementarios

### *D1: Colecta de volátiles florales de arándano y kiwi para el análisis de su composición*

Para la evaluación de la composición de los volátiles de arándano se consideraron 28 compuestos volátiles identificados en 9 colectas realizadas en los cultivares Emerald (N = 4) y San Joaquín (N = 5) siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.1.2. Para cada muestra, se calculó el porcentaje de área relativa de cada uno de los compuestos identificados respecto del área total de picos sin considerar contaminantes.

Para la evaluación de la composición de los volátiles de kiwi se consideraron 31 compuestos volátiles identificados en 8 colectas realizadas en el cultivar femenino Hayward (N = 4) y en cultivares masculinos polinizadores (N = 4) siguiendo la metodología descrita en la sección 4.2.2.2. Para cada muestra, se calculó el porcentaje de área relativa de cada uno de los compuestos identificados respecto del área total de picos sin considerar contaminantes.

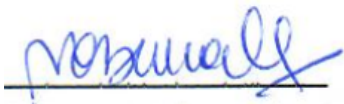
### *D2: Análisis estadístico*

Los análisis fueron realizados utilizando el programa R v3.6.2 (R Core Team, 2019). La composición de los volátiles florales de cada colecta (compuestos y porcentajes de área relativa) fue procesada en un diagrama de ordenamiento (NMDS) utilizando la función metaMDS del paquete vegan utilizando la distancia Bray-Curtis para el cálculo de la matriz de disimilitud (Oksanen *et al.*, 2018). Las nubes de puntos obtenidos para cada cultivar fueron comparadas mediante el análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) utilizando la función adonis del mismo paquete, considerando el cultivar de arándano o el tipo floral de kiwi como factor.

## Contenido bajo licencia

Las figuras 2.3, 2.4, 2.5 y 2.7 en el Capítulo 2, junto con la tabla C1 en el Anexo C, fueron reproducidas en español bajo licencia CC-BY 4.0 (Estravis Barcala *et al.*, 2019).

La tabla 3.1 y las figuras 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 en el Capítulo 3, junto con la tabla B2 en el Anexo B, fueron reproducidas en español bajo licencia CC-BY 4.0 (Estravis Barcala *et al.*, 2021).



Lic. M. Cecilia Estravis Barcala



Dr. Walter M. Farina



Dra. Florencia Palottini