

**Morfometría Geométrica como herramienta para
discriminar la incidencia del ambiente en la morfología
alar de *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera).**

Tesina de Grado - Licenciatura en Ciencias Biológicas
Sección Entomología

María Belén Bordenave Monje

Orientador: Dr. Enrique Morelli

Coorientadora: Dra. Gabriela Bentancur-Viglione

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

2023



ÍNDICE

1. AGRADECIMIENTOS	3
2. RESUMEN	4
3. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Morfometría Tradicional (MT)	7
1.2 Morfometría Geométrica (MG)	8
1.3 Asimetría Fluctuante (AF)	9
4. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo General	11
2.2 Objetivos Específicos	11
2.3 Hipótesis	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1 Área de Estudio y Muestreo	12
3.2 Procesamiento de Muestras: Montaje y Toma de Imágenes	13
3.3 Análisis de Datos	14
6. RESULTADOS	16
4.1 Error de Medición	16
4.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)	16
4.3 Análisis de Variables Canónicas (AVC)	18
4.4 Asimetría Fluctuante (AF)	22
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	25
8. BIBLIOGRAFÍA	30



AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Enrique Morelli y Gabriela Bentancur-Viglione, por su orientación a lo largo de esta investigación y por transmitirme amablemente sus conocimientos. Por su paciencia, por los momentos de laboratorio compartidos y por fomentar mi amor por los insectos.

A Hugo Benítez, quien me enseñó el uso de esta bella técnica, transmitiendo en cada paso su pasión por ella. Por su desinteresada ayuda para interpretar datos y figuras, analizando resultados de una manera que nunca imaginé posible.

A la Sección Entomología, que abrió sus puertas permitiendo que desarrolle mi pasantía en esta área.

A los miembros del tribunal evaluador de esta tesis, quienes aceptaron evaluarla y le dedicaron su tiempo.

A los apasionados por los artrópodos, especialmente por las abejas, que comparten su conocimiento y que han aportado al desarrollo de esta tesina. Y a aquellos que comparten su amor a través de imágenes, a sitios como Pexels, de donde fueron tomadas las fotografías para decorar la carátula y los encabezados de estas páginas.

A mis amigos, los que comparten mi pasión por la biología y los que no, que estuvieron dispuestos a escucharme cuando lo necesité, y con los que compartí largas jornadas de estudio. Lograron convertir momentos de frustración en buenos recuerdos, sin ustedes y su compañía, estos años hubieran sido más difíciles.

Con todo mi amor, a mi familia, mis primeros maestros, que a pesar de no compartir esta pasión conmigo, me enseñaron a esforzarme por aquello que me apasiona y dar lo mejor de mí en cada momento. Por su consejo, su cuidado, su compañía y por sobre todo, por su comprensión y amor a lo largo de estos años.

A Juan, Julia, Flor y Fran: les dedico estas páginas.



RESUMEN

Las abejas son los polinizadores más especializados, contribuyendo a la polinización de diversas especies vegetales. Estos insectos interactúan fuertemente con el ambiente que los rodea y pueden ser utilizados para monitorear el estrés ambiental y modificaciones de hábitat, generado principalmente por el uso de agroquímicos. En Uruguay, son comercializados numerosos insecticidas potencialmente letales para las abejas, cuyos efectos pueden reflejarse en la morfología alar de las abejas. En la actualidad estamos ante una crisis de los polinizadores, la cual ha desencadenado numerosas investigaciones para mitigar los posibles daños. En la presente investigación se propuso determinar una correlación entre la morfología alar de *Apis mellifera* y el ambiente utilizando Morfometría Geométrica. Dicha herramienta brinda estrategias para estudiar la variación de las estructuras biológicas y su covariación con otras variables, permitiendo el estudio preciso de variaciones morfológicas en las alas como consecuencia de los cambios ambientales. Fueron muestreadas 15 colmenas en Cebollatí (Rocha), Lascano (Rocha) y Canelones (Ruta 6, Sauce), 5 por localidad, durante los años 2019 y 2020 contemplando las estaciones de verano, otoño, invierno y primavera. Se diseccionaron 45 abejas por colmena, de las cuales se extrajeron, montaron y fotografiaron las alas anteriores. Las alas fueron digitalizadas utilizando el software libre tpsUTIL y se establecieron 19 landmarks representativos de la forma del ala mediante el uso del software libre tpsDIG2, los análisis de Morfometría Geométrica fueron realizados usando el software libre MorphoJ. Las distancias morfológicas extraídas del Análisis de Variables Canónicas mostraron diferencias entre Canelones/Lascano, Canelones/Cebollatí y Lascano/Cebollatí ($p < 0.0001$). Se encontró asimetría entre las alas de las poblaciones estudiadas de *A. mellifera* ($p < .0001$), la cual fue mayor en Canelones respecto a Cebollatí y Lascano, a la vez que en Cebollatí se encontraron individuos con tamaño alar pequeño y en Canelones se encontraron individuos con tamaño alar grande. La Morfometría Geométrica nos permitió discriminar la morfología alar entre las poblaciones. Las hipótesis establecidas fueron aceptadas, la morfología alar de *A. mellifera* varía según el ambiente en el cual habitan. Las variaciones en el uso del suelo, podrían ser una explicación a las variaciones morfológicas encontradas en la morfología alar de abejas. Lo mismo podemos suponer sobre la presencia de asimetría fluctuante en las distintas poblaciones estudiadas y su relación con el ambiente donde se encuentra el apiario.



INTRODUCCIÓN

A pesar de que muchos insectos son polinizadores, como dípteros, coleópteros, tisanópteros, himenópteros y lepidópteros, las abejas son los más especializados (Michener, 1974). Estos insectos requieren en estado larval una gran cantidad de polen y néctar, que son proporcionados por la actividad de las obreras recolectoras contribuyendo así con la polinización de las distintas especies vegetales. En cada viaje de recolección de polen o néctar las abejas visitan preferentemente una sola especie vegetal (Free, 1963), comportamiento que fundamenta su cualidad como vector polinizador. Aproximadamente 20.000 especies de abejas han sido citadas para el planeta polinizando vegetación natural y cultivos (Martinez-Puc & Merlo-Maydana, 2014; Ascher & Pickering, 2020; Santos, 2019). La mayoría de estas especies son solitarias y sólo unas pocas construyen sociedades relativamente estables (Michener, 2007), resultando un agente polinizador clave por la estabilidad de sus colonias (Cordara, 2005). *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) es la especie más abundante y ha sido tradicionalmente utilizada por el ser humano por su plasticidad en la polinización de diversos cultivos (Winston, 1987). Con colonias productoras de miel, polen, cera y propóleos, son insectos apreciados por el hombre desde la antigüedad, quien las ha domesticado y ha podido mantenerlas en colmenas artificiales (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022). Esta práctica ha permitido movilizar las colonias para polinizar cultivos, asegurando una mejor producción de frutos y semillas (Westwood, 1982; De La Cuadra, 1992; Lopez & Sotomayor, 1992; Cordara, 2005). Las abejas interactúan fuertemente con el ambiente que las rodea, recolectando agua e insumos vegetales que contienen distintos compuestos químicos que luego depositan y concentran en la colmena (Santos et al., 2009; Carrasco-Letelier et al., 2012). En Uruguay, *A. mellifera* fue introducida desde Europa en 1984 (Cordara, 2005; Mutay Luzardo et al., 2021). El registro nacional de propietarios de colmenas en Uruguay documenta 616.964 colmenas manejadas por 2.638 productores en todo el territorio (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2023). En la última zafra 2021/22 la producción de miel superó las 13 mil toneladas, en 2021 se exportaron 10.598 toneladas y para 2022 una cifra similar (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca & Oficina de Programación y Política Agropecuaria, 2022). El servicio de polinización a diferentes cultivos es un rubro secundario del sector apícola, pero muy valorado para asegurar la formación de frutos de distintas especies cultivadas como trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol blanco (*Trifolium repens*), alfalfa (*Medicago sativa*), girasol

(*Helianthus annuus*), manzanos (*Malus domestica*), ciruelos (*Prunus domestica*), duraznos (*Prunus persica*), entre otros. El valor de la polinización entomófila en el sector granjero uruguayo fue estimada en aproximadamente 115 millones de dólares, con algo más de 80 millones correspondientes a la acción polinizadora de las abejas (Santos, 2019). En este sentido, es primordial conocer las interacciones de las abejas con la flora de los diferentes ambientes productivos para así proteger tanto las poblaciones de las mismas, como el lugar en el cual habitan. Las abejas pueden ser utilizados para monitorear el estrés ambiental causado por enfermedades, parásitos, predadores, así como por factores químicos y físicos, en particular agroquímicos y modificaciones de hábitat. Las abejas han sido utilizadas para evaluar la contaminación atmosférica (Kevan, 1999), como importantes modelos para estimar cambios en la calidad ambiental, sobre todo aquellos generados debido al uso de agroquímicos. De esta manera, se podrían desarrollar estrategias adecuadas para evitar o mitigar posibles daños (Carrasco-Letelier et al., 2012). En la actualidad se ha instalado lo que se conoce como “crisis de polinizadores”, generando gran preocupación a nivel mundial por las consecuencias económicas y ambientales que conlleva (Branchiccela et al., 2019). Se ha demostrado que la pérdida de especies polinizadoras en Europa a lo largo del siglo pasado fue acompañada de la extinción de especies botánicas dependientes de la polinización por estas especies (Biesmeijer et al., 2006). En Uruguay, la evaluación del riesgo de exposición de abejas a agroquímicos debería considerar la existencia de siete grandes eco-regiones nacionales, definidas por la variabilidad geomorfológica y biótica del país (Brazeiro et al., 2012; Brazeiro, 2015), dada la variedad floral y las diversas situaciones productivas agropecuarias con efectos ambientales particulares (Carrasco-Letelier et al., 2012). A nivel nacional, Pareja et al. (2011) reportan la presencia de residuos de insecticidas (fipronil, imidacloprid, endosulfan, cumafos, cipermetrina, etion y clorpirifos) en apiarios uruguayos; Ríos et al. (2010) registran la presencia de residuos de endosulfan en cera y abejas, y de cipermetrina y cialotrina en abejas para Esteros de Farrapos, Río Negro; Niell et al. (2015) muestran la potencialidad de la colmena como biomonitor ambiental; y Niell et al. (2017) evidencian mediante un ensayo como la abeja transfiere agroquímicos del cultivo a la colmena. No se ha logrado identificar una única causa del descenso de la población de abejas, sino que hay varios factores asociados como: la agricultura intensiva y el uso de plaguicidas; la malnutrición de las abejas; los virus, los ataques de agentes patógenos y especies invasoras; los cultivos modificados genéticamente y los cambios medioambientales (fragmentación y pérdida de los hábitats) (Branchiccela et al., 2019; European Food Safety Authority, 2022). *Apis mellifera* no

es la única especie afectada, de hecho, muchas poblaciones de insectos polinizadores están en declive. Esto puede ser causado por cambios en las condiciones ambientales, como pérdida de hábitat, cambio climático, especies invasoras, calidad y cantidad de la oferta floral. La flora apícola se ve afectada por cambios en el suelo, fragmentación de paisaje y exposición a agroquímicos, que puede originar intoxicación aguda en abejas durante el pecoreo e intoxicación de la colmena por el ingreso de néctar contaminado (Carrasco-Letelier et al., 2012). A su vez, la disminución de las poblaciones de abejas melíferas también puede afectar el mantenimiento de la diversidad de plantas, estabilidad del ecosistema, producción agrícola, seguridad alimentaria y el bienestar humano (Thomann et al., 2013). Para tener un mayor conocimiento de la situación, la Unión Europea ha estado apoyando varios proyectos de investigación sobre la salud de las abejas, incluyendo proyectos de investigación sobre polinizadores. Para Uruguay la mayoría de los estudios han sido enfocados en la problemática del impacto de los agroquímicos en colonias de *A. mellifera* describiéndose la relación de la colmena con el ambiente respecto a residuos de agroquímicos (Carrasco-Letelier et al., 2012).

Morfometría Tradicional (MT)

Durante siglos, la comparación de caracteres anatómicos entre organismos ha sido un elemento central de la biología comparada. Históricamente la clasificación taxonómica y la comprensión de la biodiversidad han basado sus fundamentos en descripciones morfológicas (Adams et al., 2004; Adams et al., 2013; Adams et al., 2018). Estos patrones de variación morfológica intra e intergrupales son los utilizados por la Morfometría Tradicional (MT) para la descripción de la forma de los organismos y el análisis estadístico multivariado de sus variables cuantitativas, tomando como base de análisis el tamaño como dato numérico (Toro et al., 2010) y como datos primarios distancias, índices o ángulos. El concepto de forma en MT está dado por un conjunto de mediciones lineales, como datos primarios entre dos hitos (landmarks), los cuales se pueden cuantificar y dar un valor para luego colocarlos y visualizarlos a través de tablas, pero las mismas resultan poco intuitivas (Benitez & Puschel, 2014).

Para llevar a cabo el análisis de la forma, son necesarios los procedimientos geométricos, que no son incluidos en la MT, por lo que resulta una herramienta limitada, siendo hoy día, su aplicación puesta a prueba en ciertas áreas (Toro et al., 2010). A su vez, el efecto del tamaño resulta un inconveniente y a pesar de que se han propuesto diversos métodos de corrección para extraer la «shape» (forma pura),

como utilización de índices y proporciones o transformaciones de las variables de diversas maneras (Benitez & Puschel, 2014), los mismos han sido evaluados, pero no resultan ser recomendados dada la carencia de resultados del todo satisfactorios (Jungers et al., 1995). Cabe destacar que los análisis de MT no permiten la recuperación de la forma en estudio, sino que entregan una forma abstracta de la estructura (Rohlf & Marcus, 1993).

Morfometría Geométrica (MG)

La Morfometría Geométrica (MG) ha brindado nuevas estrategias para visualizar una estructura. A diferencia de la MT, que utiliza las distancias lineales entre dos puntos anatómicos, la MG es el estudio de la variación de las conformaciones biológicas y su covariación con otras variables (Adams et al., 2004), permitiendo el estudio de la forma independientemente de los componentes que no definen la geometría intrínseca del objeto, como son los efectos de la escala, la rotación y la traslación (Toro et al., 2010; Klingenberg, 2013). La MG constituye una herramienta importante en análisis taxonómicos y sistemáticos, con ventajas significativas sobre la MT (Toro et al., 2010; Kendal et al., 1999), permitiendo una mejor aproximación a las medidas de variación de formas entre organismos y su relación con el ambiente con análisis robustos y herramientas gráficas y conlleva a una eficaz interrelación con otras disciplinas de la ciencia (Dryden & Mardia, 1993; Jolliffe, 2002; Benítez & Püschel, 2014). La MG está basada en el álgebra matricial de manera de proporcionar resultados visuales, la geometría de un objeto se obtiene a partir de la colocación de hitos (landmarks) que los vemos como puntos sobre la estructura y la forma se describe en términos de relación espacial entre los mismos (Toro et al., 2010; Klingenberg, 2013). La técnica de Thin Plate Spline (TPS) busca componentes no uniformes del cambio de la forma a través de los movimientos de hitos (landmarks) entre los objetos estudiados, permitiendo así el análisis de los cambios producidos en la forma en diferentes contextos ecológicos y evolutivos (Benítez & Püschel, 2014). Las principales ventajas de la utilización de la MG son: la velocidad de la recolección de material de prueba (varias imágenes de distintas estructuras anatómicas pueden ser digitalizadas y analizadas en un mismo día) (Lyra et al., 2010); los bajos costos metodológicos; resultados muy confiables y comparativos que permiten estudiar cambios ambientales que afectan al organismo, con un alto grado de precisión (Calle et al., 2008; Zelditch et al., 2012). El proceso de la MG comienza seleccionando landmarks sobre las estructuras biológicas, para luego convertirlos en coordenadas. En ellas está contenida la información de la variación de la forma biológica. Luego de procesadas dichas coordenadas, mediante la MG se

puede estudiar la variación de la forma biológica, libre de componentes que no definen la geometría intrínseca del objeto y su co-variación con otras variables (Bookstein et al., 1989; Bookstein et al., 1996). La MG posibilita identificar individuos a partir de la forma de estructuras específicas, basado en métodos de discriminación y análisis estadísticos de la variación de la forma en estructuras particulares en y entre individuos (Vasquez & Liria, 2012; Bookstein et al., 2017). Esta metodología se ha utilizado en diversidad de organismos, y particularmente en artrópodos, Tofilski (2008) realizó la identificación de especies y subespecies de *A. mellifera* mediante el patrón de venación, mientras que los estudios de Mazed (2011) y Abou-Shaara & Al-Ghamdi (2012) han permitido discriminar subespecies de *A. mellifera* mediante el estudio de la asimetría de las alas anteriores. Genaro (2004) describe la variación morfológica en abejas dependiendo de las características del hábitat. En Uruguay, Gimenez Martinez et al. (2017) realizaron estudios de correlación morfométrica en abejas y ácaros. Las alas de los insectos brindan información taxonómica importante a nivel específico e intraespecífico y pueden ser fácilmente analizadas mediante técnicas de MG ya que son estructuras bidimensionales y fácilmente digitalizadas (Bolufe et al., 2014). La MG ha sido utilizada para estudiar las diferencias entre alas anteriores y posteriores en función de las estaciones a lo largo del año, ubicación geográfica o sexo, ya que la forma y tamaño de las alas en insectos son los primeros caracteres morfológicos en cambiar ante la influencia ambiental (Balaško et al., 2022), de manera que se obtiene información importante sobre los efectos de los factores ecológicos en la morfología de los insectos (Pajač Živković et al., 2018).

Asimetría Fluctuante (AF)

La mayoría de los animales tienen simetría bilateral, por lo que vemos el lado derecho e izquierdo como imágenes especulares (Klingenberg, 2015; Nunes et al., 2015; Benitez et al., 2020). En las alas de insectos hay «matching symmetry», un tipo de simetría bilateral donde la estructura es simétrica en dos copias separadas, una a cada lado del cuerpo, las cuales pueden moverse y emparejarse (Klingenberg, 2015). La Asimetría Fluctuante (AF) es una herramienta que nos permite medir pequeñas desviaciones al azar entre el lado izquierdo y derecho en organismos con este tipo de simetría al hacer coincidir una copia con la otra lo mejor posible, siendo las diferencias encontradas resultado de la asimetría (Benitez & Parra, 2011). Esta herramienta puede ser utilizada para estudiar la capacidad de una especie de mantener un fenotipo adaptado a un conjunto de condiciones ambientales y genéticas, ya que ante un cambio como pueden ser temperaturas extremas o el contacto con químicos, la AF puede aumentar (Vilaseca et al., 2022). Se puede

analizar la resistencia a perturbaciones durante el desarrollo ontogénico estudiando cambios morfológicos ante diversos tipos de estrés (Benitez & Parra, 2011; Nunes et al., 2015).

La AF es encontrada en la mayoría de los organismos, y no es necesariamente perjudicial, hay desviaciones ya que los procesos de desarrollo no son completamente determinísticos (Benítez et al., 2020). La plasticidad fenotípica es sumamente importante para un organismo adaptarse a diversos ambientes permitiendo su mantenimiento y la AF permite medirlo, *Apis mellifera* tiene una gran plasticidad y puede establecerse en distintas regiones debido a su capacidad adaptativa a variaciones estacionales y a diversos niveles de presión ambiental, por lo que la AF puede utilizarse como indicador del impacto ambiental (Nunes et al., 2015).

La metamorfosis que sufren los insectos está regulada por un sistema hormonal complejo en el que intervienen principalmente la hormona de la muda (HM) y la hormona juvenil (HJ) (Viñuela et al., 1991), variaciones en la misma pueden producir efectos morfogénicos (Koch, 1977; Klingenberg, 2016). Se ha observado que el uso intensivo de agroquímicos es dañino para todos los insectos, incluyendo a los polinizadores, ya que el manejo intensivo en hábitats agrícolas se torna estresante para dichos organismos en todas las etapas de desarrollo y el impacto es diferente dependiendo de los plaguicidas, ya sean utilizados de forma individual o en conjunto (Ivanković Tatalović et al., 2020). También, el Virus de las Alas Deformes, transmitido por el ácaro *Varroa destructor* que se encuentra comúnmente en las colmenas (Chen & Siede, 2007), afecta las alas de las abejas, y está asociado a la pérdida de colonias (De Miranda & Genersch, 2010). Para estimar las variaciones producidas en la morfología de los insectos, es utilizada la AF (Ivanković Tatalović et al., 2020).

Esta tesina se enmarca en el proyecto CSIC “Morfometría Geométrica como herramienta para discriminar la incidencia del estrés ambiental en la población de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) en la Cuenca de la Laguna del Cisne, Canelones”. Lo novedoso de esta propuesta es la incorporación de una herramienta de fácil aplicación y rápida visualización en la detección de cambios morfológicos en relación a distintas dietas y la exposición a factores de estrés ambientales en poblaciones de *A. mellifera*.



OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar una correlación entre la morfología alar de *Apis mellifera* y el sitio donde se encuentra el apiario bajo diferentes usos del suelo utilizando Morfometría Geométrica.

Objetivos específicos

1. Establecer una relación entre variaciones morfológicas de las alas de las abejas obreras y los sitios con diferentes sistemas productivos.
2. Establecer una correlación entre un posible cambio morfológico alar de las abejas obreras y distintos momentos del año.
3. Analizar si existe asimetría fluctuante en las abejas obreras en los distintos sistemas.

Hipótesis

Existe una correlación entre la morfología alar de *Apis mellifera* y el ambiente en el cual habitan.

Hay asimetría fluctuante en *A. mellifera* como producto del efecto del ambiente en la ontogenia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio y Muestreo

Se utilizaron muestras tomadas en el marco del proyecto CSIC “Morfometría Geométrica como herramienta para discriminar la incidencia del estrés ambiental en la población de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) en la Cuenca de la Laguna del Cisne, Canelones”.

Estas muestras corresponden a 15 colmenas de tres apiarios, ubicados en distintas localidades geográficas, relevadas en los meses de enero, abril, agosto y noviembre de 2019 y abril de 2020, contemplando las estaciones de verano, otoño, invierno y primavera. En cada uno de los apiarios se seleccionaron al azar 5 colmenas que fueron marcadas para sacar muestras en diferentes épocas del año. La muestra fue tomada del interior de la cámara de cría, con ayuda de bolsa que se pasa desde el cabezal hasta la base del cuadro, de los panales alejados al nido. Los ejemplares fueron preservados en etanol 70% hasta su posterior procesamiento. En el año 2020, los muestreos fueron interrumpidos por las restricciones propias de la pandemia, lo que impidió que se completaran las réplicas.

Las abejas se recolectaron de apiarios ubicados en Canelones (ruta 6, km 42), Cebollatí (Rocha) y Lascano (Rocha) (Fig. 1), en sus proximidades se desarrollan diversas actividades. En Canelones se realiza horticultura y agricultura, en Cebollatí se encuentran cultivos de arroz y ganadería de campo cultivado, y en Lascano campo natural donde se desarrolla ganadería, además de estar próximo a la ciudad.

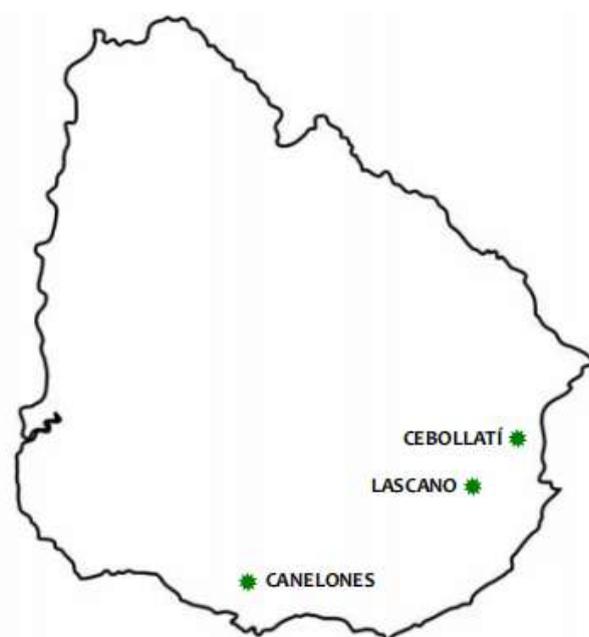


Figura 1. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo donde fueron colectadas las abejas.

Procesamiento de Muestras: Montaje y Toma de Imágenes

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en la sección Entomología (Facultad de Ciencias, UdelaR), donde se diseccionaron 45 abejas obreras por colmena de las cuales se extrajeron el par de alas anteriores para su montaje semipermanente en porta y cubreobjetos. Cada ala fue fotografiada individualmente con una cámara fotográfica Dino-Eye incorporada a un microscopio estereoscópico, las imágenes fueron ingresadas a un banco de datos con la correspondiente identificación de procedencia y lote. Se elaboró una nomenclatura para la identificación de cada par de alas, la cual incluye la ubicación, el año y el mes de recolecta, el número asignado al ejemplar y si el ala es izquierda o derecha (Fig. 2).



Figura 2. Montaje de las alas de las abejas obreras con la etiqueta correspondiente (imagen superior izquierda), conservación de los individuos en frascos con etanol 70% (imagen superior derecha), almacenaje de frascos con los individuos y alas montadas (imagen inferior).

Análisis de Datos

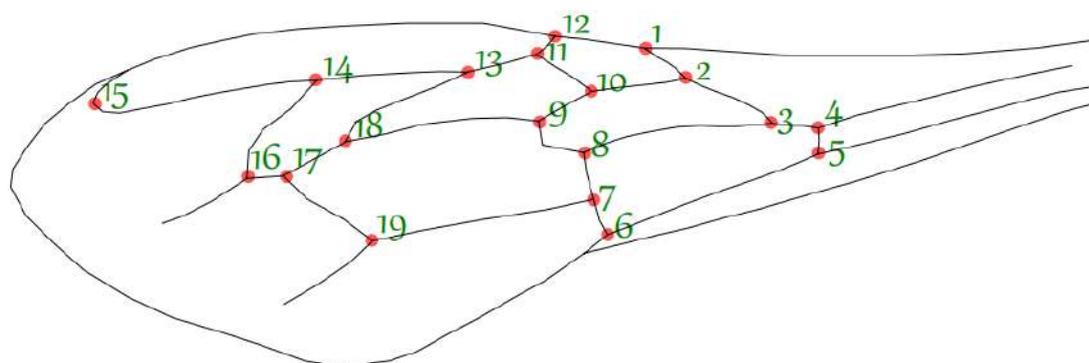


Figura 3. Representación gráfica del ala derecha de *A. mellifera* con los 19 landmarks establecidos.

Las alas fueron digitalizadas a partir de las imágenes tomadas mediante el uso del software libre tpsUTIL. Se establecieron 19 puntos de referencia (landmarks) representativos de la forma del ala (Fig. 3), siguiendo a Francoy et al. (2008) y con variaciones, los mismos fueron ingresados manualmente mediante el software libre tpsDIG2.

Los análisis de Morfometría Geométrica se realizaron con el programa de libre acceso MorphoJ. Se eliminaron los aspectos de escala, traslación y rotación para estandarizar cada muestra según el tamaño de centroide a través de un Análisis de Procrustes. Para evaluar las posibles variaciones morfológicas de las alas en relación a los distintos agroecosistemas, el mes y el año en el que fueron muestreadas, se utilizaron los clasificadores “uso de suelo”, “año” y “mes”. Se creó un clasificador mixto entre “uso de suelo” y “año” para encontrar las características de forma alar que mejor discriminan los grupos de individuos. Se realizó una matriz de covarianza, la cual tiene valores ordenados de covarianzas de relaciones entre los organismos, a partir de los cuales se realizaron los análisis multivariados. Para estudiar la variación de la forma alar entre poblaciones se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Para evaluar la influencia de la alometría en los datos, se calculó una regresión multivariada sobre el tamaño del centroide. Se usó un Análisis de Variables Canónicas (AVC) para amplificar la variación de la forma de las alas entre los grupos y obtener una mejor visualización de aquellos discriminados, para ello se realizaron 10000 permutaciones utilizando las distancias de Mahalanobis y Procrustes. Para evaluar la presencia de asimetría fluctuante (AF), los landmarks fueron digitalizados dos veces en todos los pares de alas, sobre las cuales se realizó un análisis de Procrustes ANOVA para verificar interacciones individuo*lado y los cuadrados medios (MS) de las interacciones individuo*lado, así como el valor de significación estadística. Para observar los grupos promediados, se

ejecutó un promedio de la forma a partir de los clasificadores establecidos, sobre el cual se realizó un ACP para visualizar cuán diferentes y distantes son.

Se determinó el error de medición para corroborar que los resultados no correspondan a un error de digitalización. Para ello se tomó un subset de 100 alas, a las cuales se le colocó los landmarks en dos ocasiones y se comparó los valores cuadráticos medios (MS) de individuos y errores mediante un Procrustes ANOVA.

RESULTADOS

Se trabajó con 3 apiarios, de los cuales se obtuvieron 15 lotes de 45 abejas obreras, siendo diseccionadas, montadas y fotografiadas un total de 675 pares de alas.

Error de Medición

El Procrustes ANOVA para evaluar el error de medición mostró que el cuadrado medio de la variación individual superó el error de medición: error de MS: 0,0000010673 < individual de MS: 0,0000457084 (Tabla 1).

Centroid Size					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Individual	2.6374	0,053824	49	35,26	<.0001
Error 1	0,076328	0,001527	50	0,8	0,8018
Residual	0,189839	0,001898	100		

Shape, Procrustes ANOVA							
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	0,0761502	0,0000457084	1666	42,82	<.0001	27,86	<.0001
Error 1	0,00181447	0,0000010673	1700	0,19	1	7,09	1
Residual	0,01907446	0,0000056101	3400				

Tabla 1. Procrustes ANOVA para el tamaño de centroide y forma de *A. mellifera*. SS (suma de los cuadrados) y MS (media de los cuadrados) están expresados en distancias de Procrustes.

Análisis de Componentes Principales (ACP)

El análisis de ACP de las alas de las tres poblaciones arrojó que los tres primeros componentes explicaron el 16,552%, 11,392% y 9,135% de la variación, respectivamente (Fig. 4).

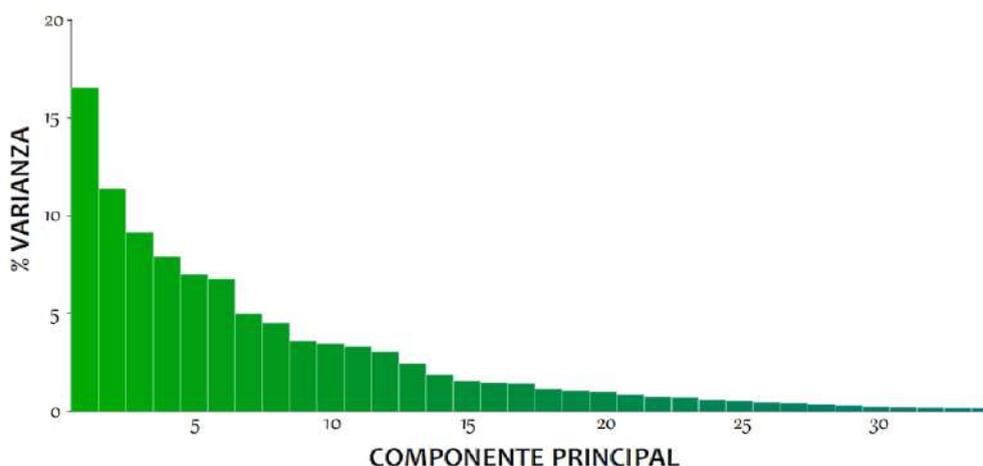


Figura 4. Porcentaje de varianza respecto a los componentes principales del ACP para las poblaciones evaluadas de *A. mellifera*.

A nivel de año-uso de suelo, el análisis reveló una superposición entre todas las poblaciones, pero la población de Lascano del año 2020 se encontró separada del resto y desplazada dentro del morfoespacio. Al observar los meses, agosto se abre ocupando más el morfoespacio respecto al resto de los meses (Fig. 5).

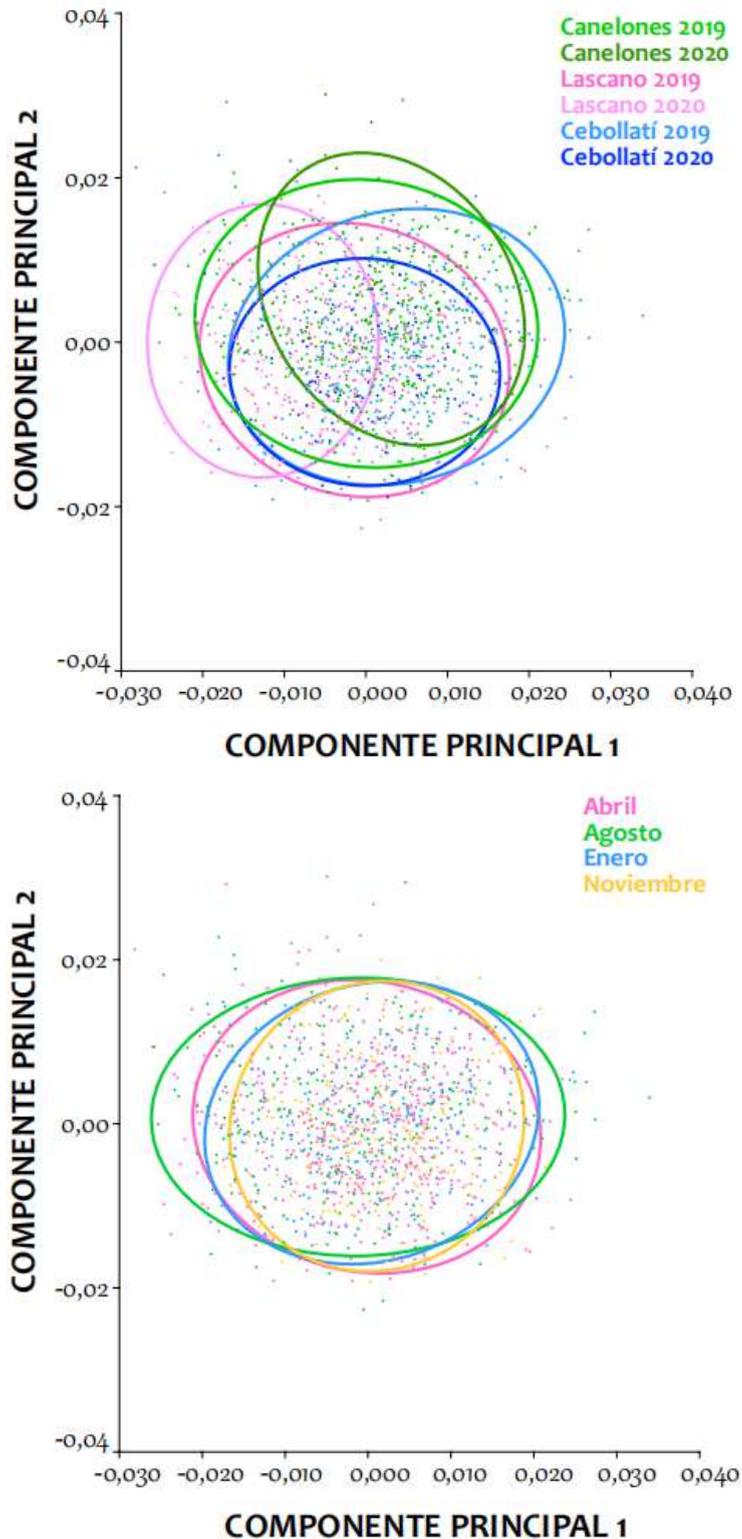


Figura 5. Análisis de Componentes Principales de las poblaciones de *A. mellifera* para los clasificadores año*uso de suelo (imagen superior) y mes (imagen inferior).

Análisis de Variables Canónicas (AVC)

El AVC realizado sobre las tres poblaciones con distintos usos de suelo, mostró una diferenciación entre ellas (Fig. 6). Las distancias morfológicas extraídas del AVC (distancias de Mahalanobis y distancias de Procrustes) luego de realizar 10000 permutaciones mostraron diferencias entre Canelones/Lascano, Canelones/Cebollatí y Lascano/Cebollatí ($p < 0.0001$) (Tabla 2).

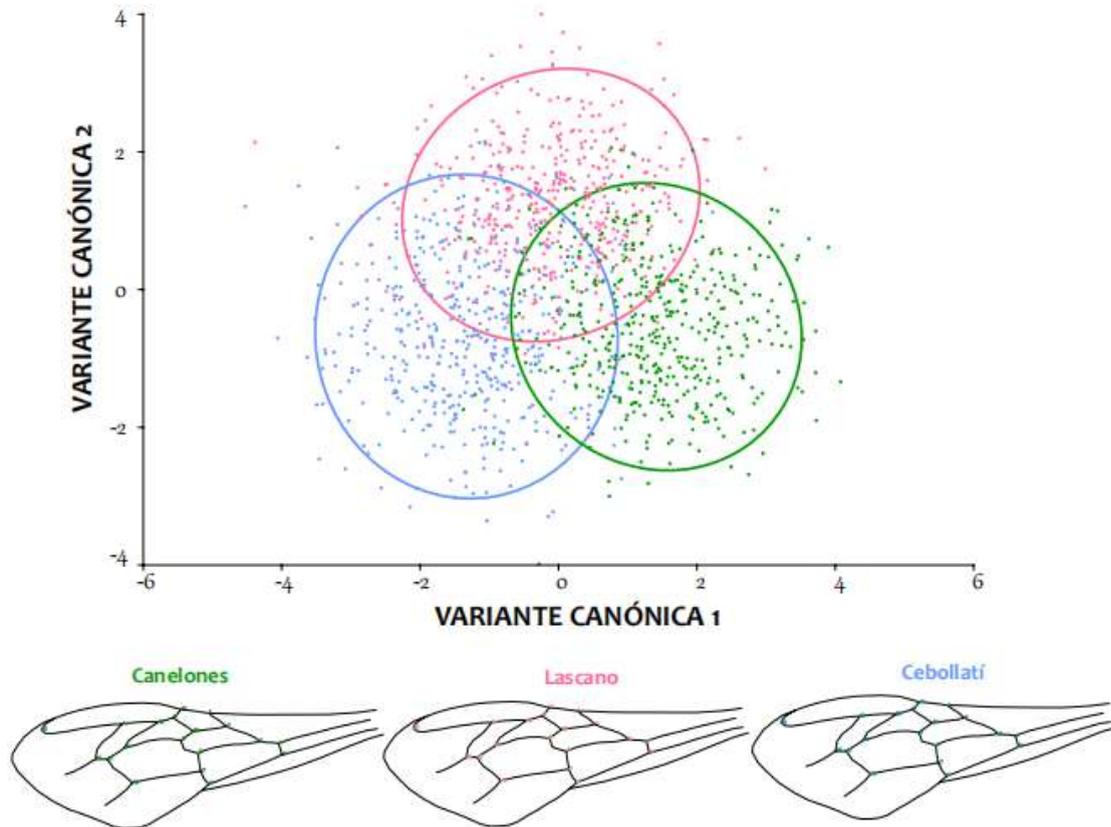


Figura 6. Análisis de Variables Canónicas de las poblaciones de *A. mellifera* para las tres poblaciones estudiadas: Canelones, Lascano y Cebollatí.

	Distancia de Mahalanobis		Distancia de Procrustes	
		Valor de p		Valor de p
Canelones*Lascano	2,3312	< 0.0001	0,0103	< 0.0001
Canelones*Cebollatí	2,7477	< 0.0001	0,0090	< 0.0001
Lascano*Cebollatí	2,2652	< 0.0001	0,0104	< 0.0001

Tabla 2. Distancias de Mahalanobis y distancias de Procrustes para las 10000 permutaciones realizadas entre las tres poblaciones evaluadas y el respectivo valor de p.

A nivel año-uso de suelo, se observa que Lascano en el año 2020 está más acotado en el centro del morfoespacio, respecto a 2019 que ocupa más del mismo. En Cebollatí ocurre lo mismo pero con un menor grado de diferencia. Para Canelones, el morfoespacio ocupado en un año y el otro es similar pero con una distribución levemente distinta (Fig. 7). Abril, agosto y enero se encuentran ocupando el mismo rango del morfoespacio respecto a la variante canónica 2, sin embargo, noviembre se diferencia ocupando más del mismo (Fig. 8).

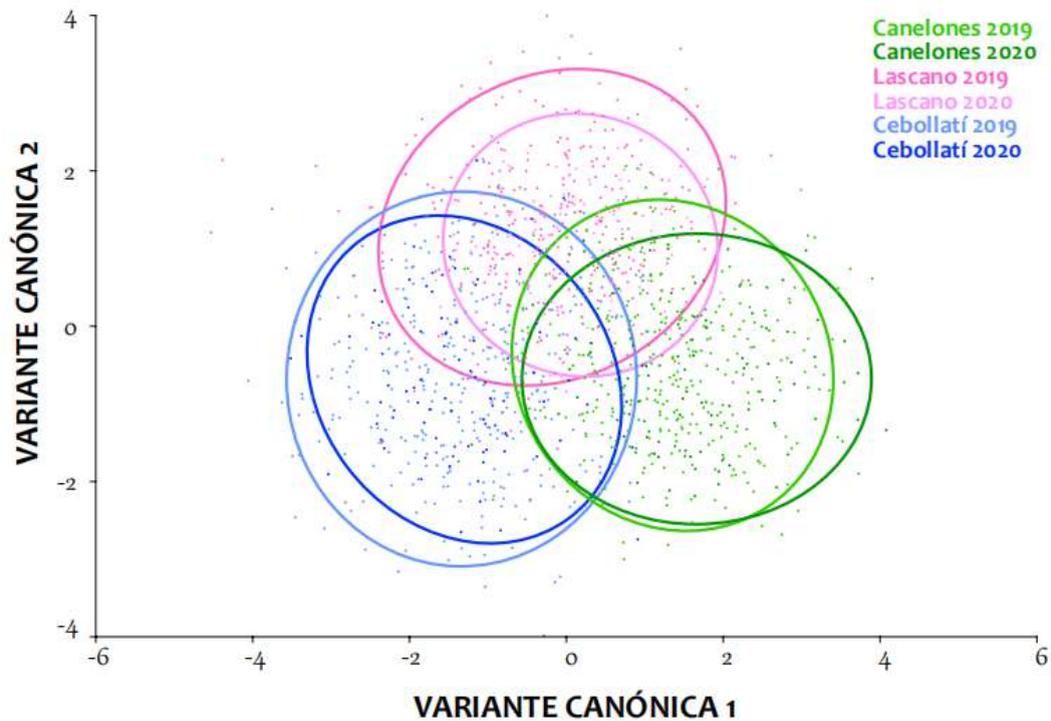


Figura 7. Análisis de Variables Canónicas de las poblaciones de *A. mellifera* para el clasificador año*uso de suelo.

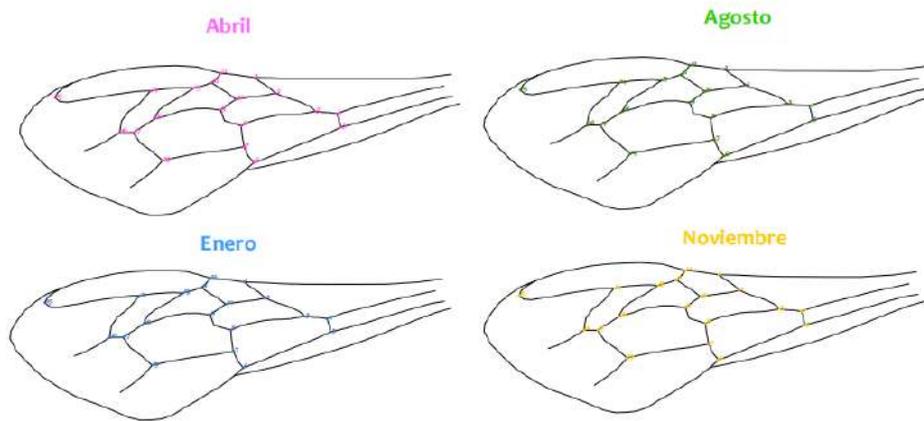
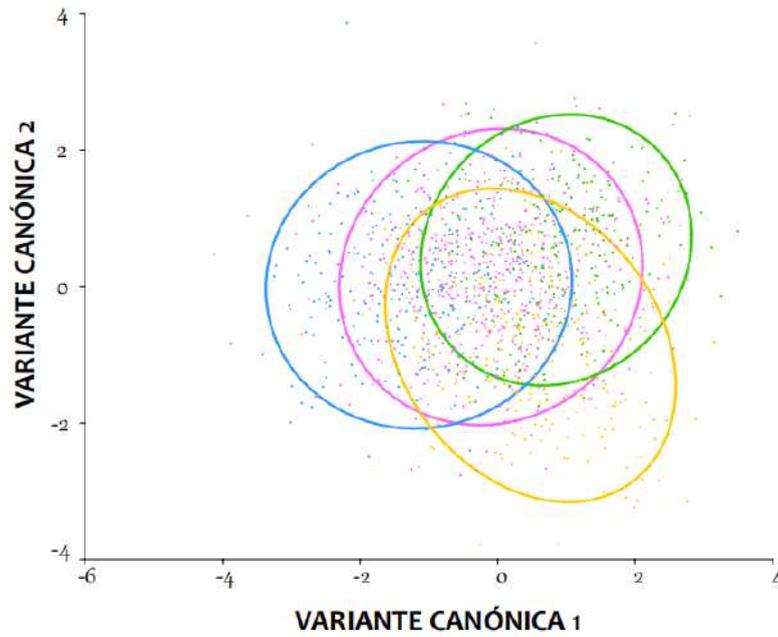


Figura 8. Análisis de Variables Canónicas de las poblaciones de *A. mellifera* para los meses analizados.

La regresión multivariada mostró que en Cebollatí el tamaño alar va de pequeño a mediano, en Lascano el tamaño alar es intermedio y en Canelones el tamaño alar va de intermedio a grande. A su vez, en Lascano se observa menor variación de la forma alar. En agosto y abril, se observa un tamaño alar intermedio, siendo más acotada la variación en agosto que en abril. En noviembre y en enero se observa más variación, se abarcan tamaños alares de pequeños a grandes. Se observa que enero es el mes que presenta mayor variación de la forma alar. En 2019 la variación fue más acotada que en 2020, en ambos años se observan individuos con tamaño alar de intermedio a grande, pero en 2019 también encontramos individuos con tamaño alar pequeño. La variación de la forma de las alas para ambos años es similar (Fig. 9).

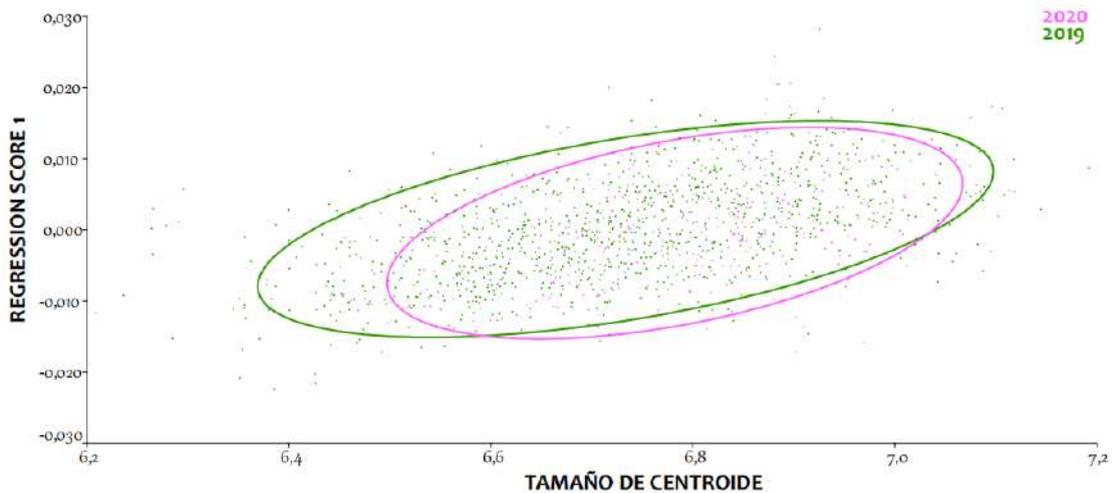
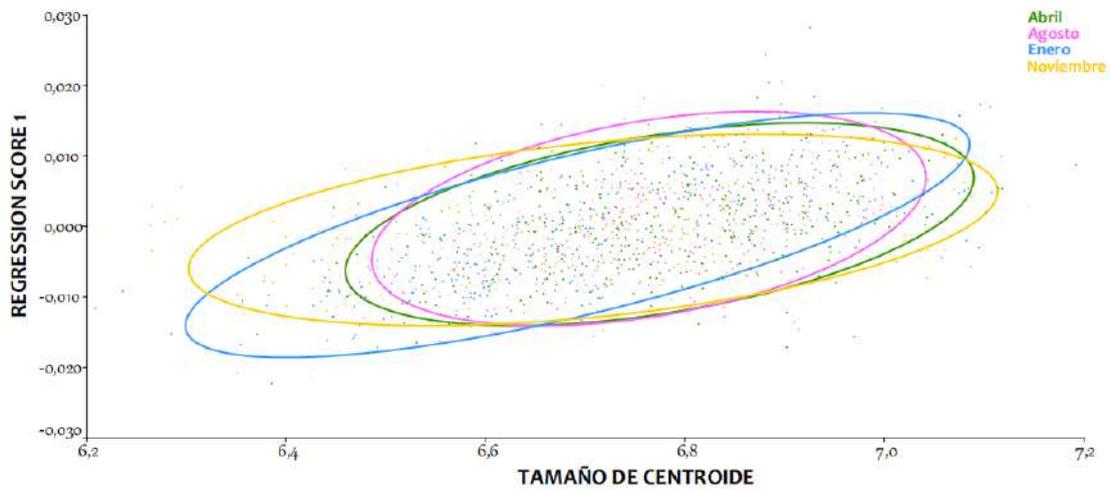
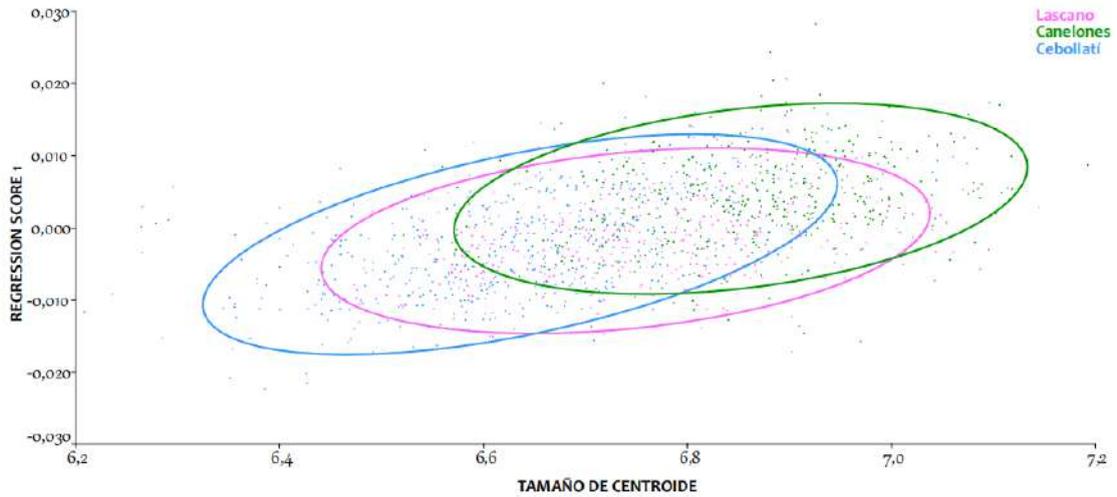


Figura 9. Análisis de regresión multivariada para las poblaciones estudiadas de *A. mellifera*, el eje y "regression score 1" corresponde a la la forma y el eje x al tamaño de centroide. Se observa la variación de la forma para los diversos usos de suelo (imagen superior), los meses analizados (imagen del medio) y los años en los que se realizó el estudio (imagen inferior).

Asimetría Fluctuante (AF)

Se encontró presencia de asimetría en las poblaciones estudiadas de *A. mellifera* ($p < .0001$). En Canelones está asimetría es mayor (0,0000099845) (Tabla 3) respecto a Cebollatí (0,0000069238) (Tabla 4) y Lascano (0,0000067207) (Tabla 5).

El valor general de asimetría calculado para las tres poblaciones en conjunto es de 0,0000084425 (Tabla 6).

Centroid Size					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Individual	14,944279	0,066716	224	31,68	<.0001
Side	0,038215	0,038215	1	18,15	<.0001
Ind * Side	0,471663	0,002106	224	22,24	<.0001
Error 1	0,042613	0,000095	450	2,12	0,0522
Residual	0,000625	0,000045	14		

Shape, Procrustes ANOVA							
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	0,41454225	0,0000544304	7616	5,45	<.0001	25,28	<.0001
Side	0,00420362	0,0001236358	34	12,38	<.0001	0,72	<.0001
Ind * Side	0,07604225	0,0000099845	7616	6,22	<.0001	20,84	<.0001
Error 1	0,02457590	0,0000016063	15300	1,25	0,0006		
Residual	0,00061158	0,0000012848	476				

Tabla 3. Procrustes ANOVA para tamaño de centroide y forma de la población de *A. mellifera* de Canelones.

Centroid Size					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Individual	18,029967	0,080491	224	50,43	<.0001
Side	0,586163	0,586163	1	367,25	<.0001
Ind * Side	0,357522	0,001596	224	23,56	<.0001
Error 1	0,030488	0,000068	450		

Shape, Procrustes ANOVA							
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	0,40913648	0,0000537207	7616	7,76	<.0001	26,84	<.0001
Side	0,02673270	0,0007862560	34	113,56	<.0001	0,91	<.0001
Ind * Side	0,05273167	0,0000069238	7616	5,94	<.0001	21,25	<.0001
Error 1	0,01784671	0,0000011665	15300				

Tabla 4. Procrustes ANOVA para tamaño de centroide y forma de la población de *A. mellifera* de Cebollatí.

Centroid Size					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Individual	16,537602	0,073829	224	51,11	<.0001
Side	0,297822	0,297822	1	206,18	<.0001
Ind * Side	0,323566	0,001444	224	26,74	<.0001
Error 1	0,024306	0,000054	450		

Shape, Procrustes ANOVA							
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	0,40770308	0,0000535324	7616	7,97	<.0001	27,17	<.0001
Side	0,02098075	0,0006170808	34	91,82	<.0001	0,91	<.0001
Ind * Side	0,05118486	0,0000067207	7616	6,01	<.0001	21,17	<.0001
Error 1	0,01709534	0,0000011173	15300				

Tabla 5. Procrustes ANOVA para tamaño de centroide y forma de la población de *A. mellifera* de Lascano.

Centroid Size					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Individual	70,565754	0,104697	674	53,54	<.0001
Side	0,747233	0,747233	1	382,09	<.0001
Ind * Side	1,318101	0,001956	674	27,21	<.0001
Residual	0,098032	0,000072	1364		

Shape, Procrustes ANOVA							
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)	Pillai tr.	P (param.)
Individual	1,31716573	0,0000574780	22916	6,81	<.0001	27,23	<.0001
Side	0,03830818	0,0011267111	34	133,46	<.0001	0,78	<.0001
Ind * Side	0,19346888	0,0000084425	22916	6,51	<.0001	21,43	<.0001
Residual	0,06012752	0,0000012965	46376				

Tabla 6. Procrustes ANOVA para tamaño de centroide y forma de las poblaciones de *A. mellifera* estudiadas.

La regresión multivariada nos mostró que varios individuos de Canelones se encuentran separados del resto de los individuos, presentando más asimetría que las poblaciones de Rocha (Lascano y Cebollatí). Cebollatí presenta más asimetría que Lascano (todos con significancia estadística $p < 0.0001$) (Fig. 10).

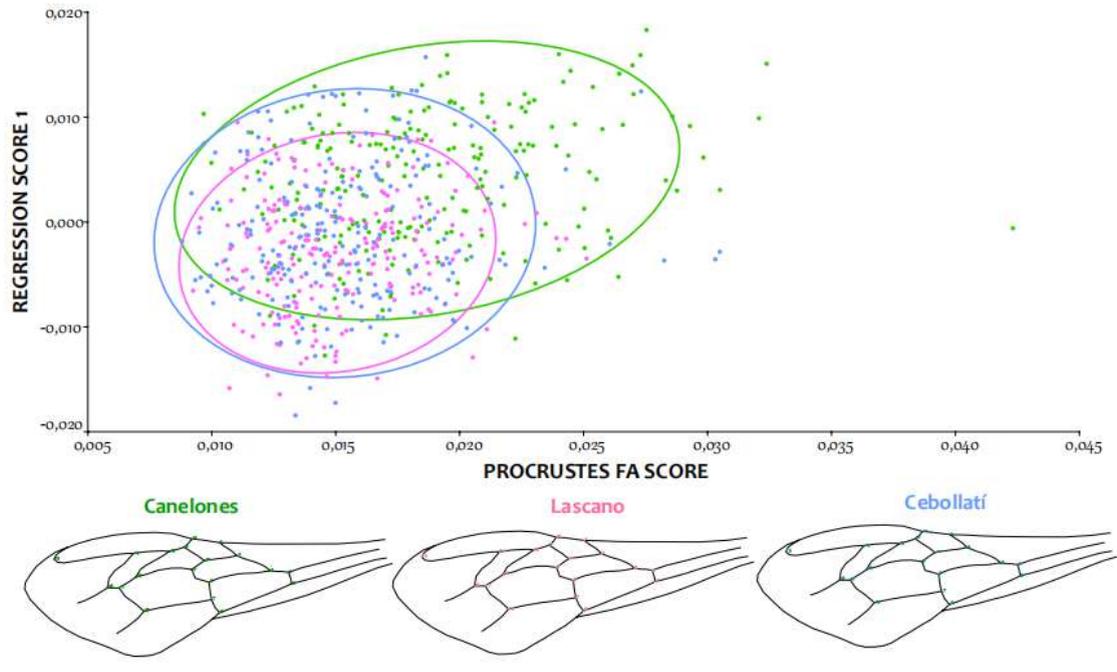


Figura 10. Análisis de regresión multivariada respecto a Procrustes FA Scores para las poblaciones estudiadas de *A. mellifera*, mostrando la intensidad de la asimetría fluctuante entre los grupos.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La Morfometría Geométrica resultó una herramienta útil para observar y analizar la variación de la forma y del tamaño de las alas de individuos de *A. mellifera* en las tres poblaciones estudiadas: Lascano, Cebollatí y Canelones, los que podrían estar asociados con los distintos ambientes del país.

Benitez et al. (2014) observó que las condiciones ambientales presentes durante el desarrollo de la larva, pueden generar diferencias en la forma del adulto. En Lascano en el año 2020, los individuos se encontraron más acotados en el morfoespacio, lo que indica menor variación de la forma de las alas entre los individuos. En los meses de enero y noviembre los individuos mostraron mayor variación, incluyendo individuos de tamaño alar pequeño a grande. De manera general, los individuos en el año 2020 presentaron mayor variación que aquellos del año 2019, teniendo en cuenta que en el 2020¹ sólo se tienen muestreos de abril. La plasticidad fenotípica es muy importante para que los organismos se adapten a diversos ambientes, cuando se observa menor variación, suele relacionarse con ambientes con más estrés, de manera que los individuos preservan una forma para enfrentar de mejor manera el ambiente (Nunes et al., 2015). El grado de africanización de las abejas también se relaciona con estas variaciones (Invernizzi et al., 2022).

En Cebollatí se encontraron individuos con tamaño alar pequeño y en Canelones se encontraron individuos con tamaño alar grande, lo que indicaría una influencia ambiental, ya que este carácter es uno de los primeros caracteres morfológicos en variar ante un cambio en el ambiente (Balaško et al., 2022), sin dejar de tener en cuenta que una de las características de la africanización de *A. mellifera* es la reducción en el tamaño alar, para confirmarlo, en una próxima etapa se realizarían análisis genéticos (Invernizzi et al., 2022). Las variaciones en el tamaño, podrían indicar un cambio ambiental en el desarrollo larval de estos individuos, ya que variaciones generadas sobre la hormona de la muda y la hormona juvenil pueden producir efectos morfogenéticos, un causante es la influencia de agroquímicos, que pueden tener un efecto endocrino en el tamaño generando una disrupción endocrina, que influye directamente en el tamaño del individuo adulto (Koch, 1977) o el efecto de la temperatura de la colmena durante el desarrollo de los individuos (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Las variaciones de temperatura, así como la

¹ Año en el que se declaró la pandemia.

frecuencia de las precipitaciones, influyen tanto en el desarrollo larvario como en la vida adulta de las abejas; temperaturas más bajas así como precipitaciones insuficientes o en momentos inadecuados disminuyen la productividad de la colonia ya que las obreras no salen de la colmena, lo que produce un descenso en las reservas de polen y néctar, dando como resultado un desarrollo prematuro de las larvas y un corto período de alimentación de las mismas, por lo que los individuos resultan más pequeños; temperaturas más altas y precipitaciones suficientes tienden a incrementar la productividad de la colonia ya que disminuye la demanda metabólica de las obreras, esto genera un desarrollo más lento de las larvas, dando individuos más grandes (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Para aseverar cuál es la variable que afecta el morfotipo de las abejas y que ocasionó una diferencia en el tamaño alar entre las poblaciones de Rocha y Canelones, se piensa evaluar los registros de temperatura en los sitios muestreados, así como estudiar si existen diferencias entre químicos encontrados en dichos sitios.

Se ha encontrado que el uso de agroquímicos reduce la salud de las abejas, sobre todo insecticidas neonicotinoides, los cuales son aplicados ampliamente en entornos agrícolas, donde las abejas no se encuentran expuestas a un sólo agroquímico, sino a una mezcla de los mismos, con efectos tóxicos difíciles de predecir (Wang et al., 2021), es probable que haya una sinergia entre estos compuestos, ante la cual las abejas son susceptibles (Almasri et al., 2020). Algunos neonicotinoides como la clotianidina, tiametoxam e imidacloprid impiden que las abejas desarrollen su comportamiento forrajero natural, incrementando la mortalidad de obreras y reduciendo el desarrollo de cría y éxito en la colonia (Henry et al., 2012). Grassl et al. (2018) llevaron a cabo un experimento donde encontraron cantidades significativas de neonicotinoides en un grupo control de abejas, por lo que los cultivos identificados como no tratados podrían tener un historial de tratamiento previo, donde los residuos de agroquímicos de aplicaciones anteriores fueron absorbidos por plantas en crecimiento, de hecho, se sabe que los neonicotinoides son químicamente estables y persisten durante períodos prolongados. El impacto ambiental de los plaguicidas es muy amplio y ocurre no solamente en el lugar de su aplicación, sino que puede hacerlo a miles de kilómetros de distancia de éste (Cárcamo, 2020).

En ambientes de agricultura, como es el caso de Canelones, se utilizan diversos agroquímicos, entre ellos el glifosato, que disminuye la oferta floral y la producción de las abejas se ve afectada, ya que hay una probabilidad elevada de ingreso del herbicida a la colmena (Invernizzi et al., 2022). Las abejas pueden encontrar

agroquímicos directamente mientras se alimentan o recolectan polen de plantas que contienen los mismos, que luego van a almacenar en la colmena. La cantidad de agroquímicos detectada suele ser en bajos niveles (Traynor et al., 2021), pero aún así pueden afectar negativamente la supervivencia y salud de las abejas (Grassl et al., 2018).

Se ha encontrado que la exposición a agroquímicos como el fungicida piraclostrobina y el insecticida fipronil afectan el proteoma de la cabeza de las abejas nodrizas, reduciendo la producción de proteínas en la jalea real, importantes en el desarrollo de las larvas, afectando la calidad y cantidad de la alimentación de la cría (Zaluski et al., 2020), lo que podría explicar la diferencia de tamaño encontrada entre las poblaciones de Rocha y Canelones. Traynor et al. (2021) notaron que al mover colonias de regiones más afectadas a menos afectadas por agroquímicos, hay impacto en la viabilidad de la cría de todas maneras, lo que indicaría efectos a largo plazo sobre la colonia; Milone et al. (2021) también observaron que colonias con mayor exposición oral a agroquímicos tenían un perfil nutricional diferente ya que la composición de la jalea real se veía afectada.

La presencia de Asimetría Fluctuante, no es necesariamente perjudicial, de hecho, está presente en todos los animales con simetría bilateral, para generar un cambio en las poblaciones, la varianza debe ser suficientemente alta (Benítez et al., 2020). La presencia de AF fue mayor en los individuos de Canelones que en aquellos de Rocha (Cebollatí y Lascano). Lascano presenta formas alares distintas pero no niveles grandes de asimetría, mientras que Cebollatí presenta más asimetría y más variación, con una mayor tendencia a presentar alas asimétricas. La AF es un indicador del impacto ambiental (Nunes et al., 2015), dado que el valor es mayor para Canelones, la diferencia podría deberse a variaciones en la temperatura, contacto con químicos (Vilaseca et al., 2022) o incidencia de patógenos (De Miranda & Genersch, 2010). Dado la proximidad de las tres poblaciones, no podemos decir que experimentan grandes diferencias de temperatura, por lo que se presume que la variación se debería al contacto con agroquímicos, que se ha documentado que tienen efectos sobre la simetría alar de *A. mellifera*. Los agroquímicos pueden causar inestabilidad en el desarrollo de las abejas, reflejado en el incremento de AF de características morfológicas, se ha encontrado que el endosulfán y profenofos pueden ser causantes de este efecto y del retraso en el desarrollo larval y emergencia de adultos (Ojeda, 2012). Para determinar la causa de estas variaciones en la asimetría, se deberían realizar otros estudios (análisis de presencia de patógenos, análisis de presencia de químicos en la colmena y las abejas y

correlación con la temperatura ambiente de los sitios). En la regresión multivariada realizada respecto a la AF, los individuos de Canelones se separan del resto, presentando una asimetría significativa, lo que indicaría que algo sucede en el ambiente.

Es importante destacar que muchos plaguicidas prohibidos en la Unión Europea y muchos otros países, están registrados y a la venta en Uruguay, siendo la gran mayoría insecticidas mortales para las abejas. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP) que afectan a estos polinizadores son 32, de un total de 81 ingredientes activos registrados bajo 330 nombres comerciales autorizados (Cárcamo, 2020). A fines de diciembre de 2019 se prohibió a la atrazina y el fention y se fijaron condiciones generales para la venta de productos a base Clotianidina, Imidacloprid, Tiametoxam y Clorpirifos, potencialmente riesgosos (Cárcamo, 2020), nuestros muestreos fueron realizados mayoritariamente durante este año, por lo que no debemos descartar la posibilidad de que estos compuestos afectaron a las poblaciones estudiadas. A pesar de esto, en el 2023 (<https://www.ambiente.gub.uy/oan/datos-abiertos/>) estos productos están incluidos en la lista de Plaguicidas Prioritarios para la Gestión Ambiental (Ministerio de Ambiente).

Este estudio mostró principalmente cambios significativos en la simetría de las alas de las abejas de Canelones, en comparación con las de Rocha, lo que muestra un cambio en el ambiente. También encontramos individuos más grandes en Canelones y más pequeños en Cebollatí, lo que podríamos atribuir a variaciones generadas sobre la hormona de la muda y la hormona juvenil consecuencia del uso de estos productos o como consecuencia de poblaciones africanizadas. La técnica de MG nos permitió cumplir los objetivos y discriminar la morfología alar entre las poblaciones, especialmente si comparamos los grupos de Rocha con el de Canelones, que muestran diferencias respecto a la AF y el tamaño alar de los individuos. Se logró establecer una diferencia del tamaño alar en los meses analizados, donde enero y noviembre presentan un tamaño alar más grande respecto a abril y agosto.

Las hipótesis establecidas son aceptadas, la morfología alar de *A. mellifera* varía según el ambiente en el cual habitan, la variación que se observa en las actividades desarrolladas en la proximidad a la colonia se reflejan en la morfología de los individuos. A su vez, comprobamos que hay AF en las poblaciones estudiadas producto del efecto ambiental, donde hay una clara diferencia entre la población de

Canelones, afectada por los posibles agroquímicos usados en agricultura comparado con las poblaciones de Rocha, que entre ellas encontramos a su vez diferencias dadas las actividades desarrolladas en su proximidad: Cebollatí se encuentra con mayor incidencia de AF producto de la ganadería de campo cultivado y los cultivos de arroz cercanos, mientras que Lascano tiene una menor incidencia, con proximidad a ganadería de campo natural.

Abriéndose nuevas investigaciones para responder las causas de las variaciones alares en *A. mellifera*: los agroquímicos usados en agricultura, horticultura y ganadería; la temperatura ambiente en los apiarios; los patógenos presentes en las colmenas; la dieta diferencial entre las colmenas de diferentes apiarios; el grado de africanización de las poblaciones.



BIBLIOGRAFÍA

Abou-Shaara, H. F. & Al-Ghamdi, A. A. 2012. Studies on Wings Symmetry and Honey Bee Races Discrimination by Using Standard and Geometric Morphometrics. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28(3), 575-584.

Adams, D. C., Rohlf, F. J. & Slice, D. E. 2004. A Field Comes of Age: Geometric Morphometrics in the 21st Century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*.

Adams, D. C., Rohlf, F. J. & Slice, D. E. 2013. A Field Comes of Age: Geometric Morphometrics in the 21st Century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24, 7-14.

Adams, D. C. & Collyer M. L. 2018. Multivariate Phylogenetic Comparative Methods: Evaluations, Comparisons, and Recommendations. *Systematic Biology*, 67(1), 14-31.

Almasri, H., Tavares, D. A., Pioz, M., Sené, D., Tchamitchian, S., Cousin, M., Brunet, J-L. & Belzunces, L. P. 2020. Mixtures of an Insecticide, a Fungicide and a Herbicide Induce High Toxicities and Systemic Physiological Disturbances in Winter *Apis mellifera* Honey Bees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 111013.

Ascher, J. S. & Pickering, J. 2020. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila)
http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species

Balaško, M. K., Bažok, R., Mikac, K. M., Benítez, H. A., Suazo, M. J., Viana, J. P. G., Lemic, D. & Živković, I. P. 2022. Population Genetic Structure and Geometric Morphology of Codling Moth Populations from Different Management Systems. *Agronomy*, 12(6), 1278.

Benítez, H. A., & Parra, L. E. 2011. Asimetría Fluctuante: Una Herramienta Morfo-Funcional para Medir Estabilidad del Desarrollo. *International Journal of Morphology*, 29(4), 1459-1469.

Benítez, H. A. & Püschel, T. A. 2014. Modelando la Varianza de la Forma: Morfometría Geométrica Aplicaciones en Biología Evolutiva. *International Journal of Morphology*, 32(3), 998-1008.

Benítez, H. A., Lemic, D., Bažok, R., Gallardo-Araya, C. M. & Mikac, K. M. 2014. Evolutionary Directional Asymmetry and Shape Variation in *Diabrotica virgifera*

virgifera (Coleoptera: Chrysomelidae): An Example Using Hind Wings. *Biological Journal of the Linnean Society*, 111(1), 110-118.

Benítez, H. A., Lemic, D., Villalobos-Leiva, A., Bažok, R., Órdenes-Claveria, R., Pajač Živković, I. & Mikac, K. M. 2020. Breaking Symmetry: Fluctuating Asymmetry and Geometric Morphometrics as Tools for Evaluating Developmental Instability Under Diverse Agroecosystems. *Symmetry*, 12(11), 1789.

Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P. M., Reemer, M., Ohlemuller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A. P., Potts, S. G., Kleukers, R., Thomas, C. D., Settele, J. & Kunin, W. E. 2006. Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785), 351–354.

Bolufe, R., Benítez, L., Rodríguez, A., Morales, A., & Mederos, E. 2014. Asimetría Fluctuante en el Diseño de Venación Alar de *Apis mellifera* en Dos Criaderos de Abejas Reina de Cuba. *Apiciencia*, 16(3), 49-60.

Bookstein, F. L. 1989. "Size and shape": A Comment on Semantics. *Systematic Zoology*, 38(2), 173-180.

Bookstein, F. L. 1996. Biometrics, Biomathematics and the Morphometric Synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 58, 313–365.

Bookstein, F. L. 2017. A Method of Factor Analysis for Shape Coordinates. *Physical Anthropology*, 164(2), 221-245.

Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C., Martínez de la Escalera, G., Mendoza, Y., Santos, E., Silva, C., Zunino, P. & Antúnez, K. 2019. Impact of Nutritional Stress on the Honeybee Colony Health. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.

Brazeiro A., Panario, D., Soutullo, Gutierrez, O., Segura, A., & Mai, P. 2012. Clasificación y Delimitación de las Eco-Regiones de Uruguay. Informe Técnico. Convenio MGAP/PPR – Facultad de Ciencias, Vida Silvestre, Sociedad Zoológica del Uruguay, CIEDUR. 40 pp.

Brazeiro A. 2015. Eco-Regiones de Uruguay: Biodiversidad, Presiones y Conservación. Aportes a la Estrategia Nacional de Biodiversidad. Facultad de Ciencias, CIEDUR, Vida Silvestre, Sociedad Zoológica del Uruguay. 122 pp.

Calle, D. A., Quiñones, M. L., Erazo, H. F. & Jaramillo, N. 2008. Discriminación por Morfometría Geométrica de Once Especies de *Anopheles (Nyssorhynchus)* Presentes en Colombia. *Biomedica*, 28, 371-385.

Cárcamo, M. I. 2020. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAP) en Uruguay. IPEN for a Toxics-Free Future.

Carrasco-Letelier, L., Mendoza, Y. & Branchiccela, M. B. 2012. Toxicidad Aguda de Abejas Uruguayas: Discrepancias con Valores de Referencia Internacionales. *Revista INIA*, 30, 59-61.

Chen, Y. P., & Siede, R. (2007). Honey bee viruses. *Advances in virus research*, 70, 33-80.

Cordara, J. J. 2005. La Historia de la Apicultura en Uruguay. Montevideo, Uruguay: Universidad de la Empresa, Facultad de Ciencias Agrarias. 101 pp.

De La Cuadra, C. 1992. Germinación, latencia y dormición de las semillas: Dormición en las avenas locas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General de Estructuras Agrarias. 23 pp.

De Miranda, J. R. & Genersch, E. (2010). Virus del ala deformada. *Revista de patología de invertebrados*, 103 , S48-S61.

Dryden I. L. & Mardia K. V. 1993. Multivariate Shape Analysis. *Sankhyā: The Indian Journal of Statistics*, 55, 460–480.

European Food Safety Authority (EFSA). 2022. Bee Health. European Food Safety Authority.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2022. Otros Productos Provenientes de las Abejas. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Francoy, T. M., Wittmann, D., Drauschke, M., Müller, S., Steinhage, V., Bezerra-Laure, M. A. F., De Jong, D. & Gonçalves, L. S. 2008. Identification of Africanized Honey Bees Through Wing Morphometrics: Two Fast and Efficient Procedures. *Apidologie*, 39, 488–494.

Free, J. B. 1963. The Flower Constancy of Honeybees. *Journal of Animal Ecology*, 32, 119-131.

- Genaro, J. A. 2004. Las Abejas de la Isla de la Juventud, Cuba (Hymenoptera: Apoidea). Boletín de la SEA, 34, 177-179.
- Giménez Martínez, P., Mendoza, Y., Invernizzi, C., Fuselli, R., Fernández, P. & Maggi, M. 2017. Morphometric Correlation Between *Apis mellifera* Morphotypes (Hymenoptera) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. Journal of Apicultural Research, 56(2), 122-129.
- Grassl, J., Holt, S., Cremen, N., Peso, M., Hahne, D., & Baer, B. 2018. Synergistic Effects of Pathogen and Pesticide Exposure on Honey Bee (*Apis mellifera*) Survival and Immunity. Journal of Invertebrate Pathology, 159, 78-86.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. 2012. Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. Science, 336(6079), 348-350.
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Arredondo, D., Branchiccela, B., Castelli, L., Juri, P., Mendoza, Y., Nogueira, E., Salvarrey, S. & Santos, E. 2022. Situación Sanitaria de las Abejas Melíferas en Uruguay: Novedades de la Última década. Veterinaria (Montevideo), 58(217).
- Ivanković Tatalović, L., Anđelić, B., Jelić, M., Kos, T., Benítez, H. A. & Šerić Jelaska, L. 2020. Fluctuating Asymmetry as a Method of Assessing Environmental Stress in Two Predatory Carabid Species within Mediterranean Agroecosystems. Symmetry, 12(11), 1890.
- Jolliffe, I. T. 2002. Principal Component Analysis for Special Types of Data. New York: Springer.
- Jungers, W. L., Falsetti, A. B. & Wall, C. E. 1995. Shape, Relative Size, and Size-Adjustments in Morphometrics. Yearbook of Physical Anthropology, 38(21), 137-161.
- Kendall, D. G., Barden, D., Carne T. K., Le, H, 1999. Shape and shape theory. Wiley. 328 pp.
- Kevan, P. G. 1999. Pollinators as Bioindicators of the State of the Environment: Species, Activity and Diversity. Agriculture, Ecosystems and Environment, 74, 373-393.

Klingenberg, C. P. 2013. Visualizations in Geometric Morphometrics: How to Read and How to Make Graphs Showing Shape Changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 15–24.

Klingenberg, C. P. 2015. Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics: Concepts, Methods, and Applications. *Symmetry*, 7(2), 843-934.

Klingenberg, C. P. 2016. Size, Shape and Form: Concepts of Allometry in Geometric Morphometrics. *Development Genes and Evolution*, 226(3), 113-137.

Koch, C. K. 1977. Acción de Reguladores del Crecimiento e Inhibidores del Desarrollo en Insectos y Ácaros. *Revista Peruana de Entomología*, 20(1), 13-17.

López, A. & Sotomayor, C. 1992. Las abejas como polinizantes en frutales. *Chile Agrícola*, 17(180), 270-273.

Lyra, M. L., Hatadani, L. M., De Azeredo-Espin, A. M. L & Klaczko, L.B. 2010. Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary new world screwworm fly. *Bulletin of Entomological Research*, 100(1), 19-26.

Martínez-Puc, J. F. & Merlo-Maydana, F. E. 2014. Importancia de la Diversidad de Abejas (Hymenoptera: Apoidea) y Amenazas que Enfrenta en el Ecosistema Tropical de Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 1(2), 28-34.

Mazeed, A. M. M. 2011. Anomalies and Asymmetry of Wing Venation Pattern in Carniolan and Egyptian bee Populations in Egypt. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 4(1), 149-161.

Ministerio de Ambiente (MA) & Observatorio Nacional Ambiental. Consultado el 13/01/2023.

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) & Oficina de Programación y Política Agropecuaria (OPYPA). 2022. Anuario 2022. Análisis Sectorial y Cadenas Productivas, Temas de Política, Estudios.

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) & Sistema Nacional de Trazabilidad de Productos Apícolas (SINATPA). 2023. Informe de Datos del RNPC (Declaraciones juradas) 2022. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Datos y Estadísticas.

Michener, C. D. 2007. *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press. 913 pp.

Michener, C. D. 1974. The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study. Belknap Press of Harvard University Press. 418 pp.

Milone, J. P., Chakrabarti, P., Sagili, R. R., & Tarpy, D. R. 2021. Colony-Level Pesticide Exposure Affects Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Royal Jelly Production and Nutritional Composition. *Chemosphere*, 263, 128183.

Mutay Luzardo, M. F., Olivera Lados, M. & Rossi, A. 2021. Mal de Río en Abejas Melíferas: Sobrevivencia Larvaria en Función de la Concentración del Mielato Consumido (Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República).

Niell, S., Jesús, F., Pérez, C., Mendoza, Y., Díaz, R., Franco, J., Cesio, V. & Heinzen, H. 2015. QuEChERS Adaptability for the Analysis of Pesticide Residues in Beehive Products Seeking the Development of an Agroecosystem Sustainability Monitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18): 4484-4492.

Niell, S., Jesús, F., Pérez, N., Pérez, C., Pareja, L., Abbate, S., Carrasco-Letelier, L., Díaz, S., Mendoza, Y., Cesio, V. & Heinzen, H. 2017. Neonicotinoids Transference from the Field to the Hive by Honey Bees: Towards a Pesticide Residues Biomonitor. *Science of the Total Environment*, 581, 25-31.

Nunes, L. A., Araújo, E. D. D. & Marchini, L. C. 2015. Fluctuating Asymmetry in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) as Bioindicator of Anthropogenic Environments. *Revista de Biología Tropical*, 63(3), 673-682.

Ojeda, P. 2012. Evaluación de Apiarios como Herramienta Ecotoxicológica (Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad de la República).

Pajač Živković, I., Lemic, D., Mešić, A., Barić, B., Órdenes, R., & Benítez, H. A. 2018. Effect of fruit host on wing morphology in *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A First View Using Geometric Morphometrics. *Entomological Research*, 48(4), 262-268.

Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., Cesio, M. V. & Heinzen, H. 2011. Detection of Pesticides in Active and Depopulated Bee Hives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(10), 3844-3858.

Pexels. <https://www.pexels.com/es-es/buscar/abejas/>. Consultado el 22/08/2022.

Ríos, M., Zaldúa, N., Carrasco-Letelier, L., Harriet, J., Pedretti, R., Baeten, G., Nieto, J., Steinhardt, M., Posse, S., Maidana, R., Ivanchenko, J., Cáceres, M. & Rosano, Á. 2010. Evaluación Participativa de Niveles de Plaguicidas en la Producción Apícola en la Cuenca del Sitio RAMSAR, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. *Vida Silvestre Uruguay*, 39-58.

Rohlf, F. J. & Marcus, L. F. 1993. A Revolution in Morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 129-132.

Santos E., Mendoza Y., Díaz R., Harriet J. & Campá J. 2009. Valor Económico de la Polinización Realizada por Abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una Aproximación. Serie Actividades de Difusión INIA, 568, 25-28.

Santos, E. 2019. Fortalecimiento de las Capacidades para la Gestión Ambientalmente Adecuada de Plaguicidas Incluyendo COPS. Consultoría en Conservación de Polinizadores, Producto 1.

Tofilski, A. 2008. Using Geometric Morphometrics and Standard Morphometry to Discriminate Three Honeybee Subspecies. *Apidologie*, 39(5), 558-563.

Toro, I. M. V., Manriquez, S. G. & Suazo, G. I. 2010. Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977-990.

Traynor, K. S., vanEngelsdorp, D. & Lamas, Z. S. 2021. Social Disruption: Sublethal Pesticides in Pollen Lead to *Apis mellifera* Queen Events and Brood Loss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, 112105.

vanEngelsdorp, D. & Meixner, M. D. 2010. A Historical Review of Managed Honey Bee Populations in Europe and the United States and the Factors that May Affect Them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S80-S95.

Vásquez, M. & Liria, J. 2012. Morfometría Alar para la Identificación de *Chrysomya albiceps* y *C. megacephala* (Diptera: Calliphoridae) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 60(3), 1249-1258.

Vilaseca, C., Pinto, C. F., Órdenes-Claveria, R., Laroze, D., Méndez, M. A., & Benítez, H. A. 2022. Insect Fluctuating Asymmetry: An Example in Bolivian Peridomestic Populations of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). *Symmetry*, 14(3), 526.

Viñuela, E., Budia, F. & Del Estal, P. 1991. Los Insecticidas Reguladores del Crecimiento y la Cutícula. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 17(3), 391-400.

Wang, Y., Zhu, Y. C., Li, W., Yao, J., Reddy, G. V., & Lv, L. 2021. Binary and Ternary Toxicological Interactions of Clothianidin and Eight Commonly Used Pesticides on Honey Bees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, 112563.

Westwood, M. 1982. *Fruticultura de Zonas Templadas*. Madrid: Mundi-Prensa Libros. 486 pp.

Winston, M. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 281 pp.

Zaluski, R., Correia Bittarello, A., Cavalcante Souza Vieira, J., Pereira Braga, C., de Magalhaes Padilha, P., da Silva Fernandes, M., de Souza Bovi, T. & de Olivera Orsi, R. 2020. Modification of the Head Proteome of Nurse Honeybees (*Apis mellifera*) Exposed to Field-Relevant Doses of Pesticides. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, D. & Fink, W. L. 2012. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier Academic Press. 488 pp.