

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**UTILIZACIÓN DE ABEJORROS NATIVOS COMO  
POLINIZADORES DE TRÉBOL ROJO (*TRIFOLIUM  
PRATENSE*) Y TOMATE (*SOLANUM  
LYCOSPERSICUN*)**

por

**Sheena Marie SALVARREY MENDOZA**

TESIS presentada como uno  
de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias Agrarias  
opción Ciencias Animales.

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
(Noviembre 2019)

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Guillermo Galván, Enrique Morelli y Martín Porrini, el (día) de (mes) de (año). Autora: Lic (Mag) Sheena Salvarrey. Director, Dr. Ciro Invernizzi, Co-director Dr. Gustavo Giménez.

Dedico este trabajo a *Diego, Patricio y Juana*.

## AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Ciro Invernizzi y Gustavo Gimenez quienes me apoyaron cada uno en su área para la realización de este trabajo.

A los miembros del tribunal quienes aceptaron participar y colaborar en este proceso de finalización; Guillermo Galván, Martín Porrini y Enrique Morelli, gracias!

Quiero agradecer a las instituciones que en diferentes modalidades han apoyado la realización de este estudio y con este, me han brindado la oportunidad de capacitarme y afianzarme en mi profesión:

- Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), en su modalidad Beca de Posgrado Nacionales (POSNAC\_2014\_1\_102699) y Fondo María Viñas (FMV\_2017\_1\_136651).
- Comisión Sectorial de Investigación científica (CSIC), en su modalidad Vinculación Sociedad Universidad-Producción (VSUP) apoyo proyecto de tomate 641 y en Movilidad.
- Comisión académica de posgrado (CAP), Beca finalización de doctorado 2017.

A los investigadores Dr. Matías Maggi y Dr. Pablo Revainera del Centro de Investigación de Abejas Sociales de la Universidad de Mar del Plata y a Dr. Santiago Plischuk del Centro de Parasitos y Vectores de la Universidad de La Plata quienes me enseñaron el mundo de los patógenos y acaros, todo un desafío para mi. Además extendiendo el agradecimiento a la gente de sus laboratorios, en ambos lugares me sentí como “en casa”.

A Dra. Karina Antúnez y MSc. Daniela Arredondo, del Laboratorio de Microbiología de Instituto Clemente Estable, por la ayuda y la buena disposición de enseñarme sobre análisis moleculares, virus y abejas melíferas. Gracias también a Loreley Castelli, por siempre estar ahí para darme una mano.

A los productores que me brindaron las instalaciones para realizar el trabajo, Jose Guarino (Noridel, Salto) y Andrés Guitierrez (Sauce,

Canelones), y a Gonzalo Eguilior por la colaboración durante la toma de datos.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA):

- A todo el equipo del Laboratorio de Semillas de INIA La Estanzuela, en especial, a Carlos Rossi que siempre está aportando sus conocimientos e interés por colaborar en todo lo que sea posible.
- Al Laboratorio de Apicultura de INIA LE; Yamandú Mendoza, Gustavo Ramallo, Sebastián Díaz y Carlos Silva. Especialmente a Yayo, uno de los responsables silenciosos que hoy esté aquí, gracias!
- Al equipo de Mejoramiento Genético de INIA Las Brujas que bajo la dirección de Gustavo Gimenez me han colaborado en tareas de campo.
- A José Buenahora del Laboratorio de Entomología de INIA- Salto Grande, por sus aportes y colaboración en el trabajo de campo.

A Carlos Silvestre y Empresa BROMETAN por brindarnos los nidos de abejorros y estar al pendiente de que el trabajo con trebol rojo salga bien. Gracias a Martín Darricareré y especialmente, a Juan Avalos, que en poco tiempo supo dar grandes consejos.

A mis estudiantes de Seminario de Introducción a la Biología, en especial a Adrián Ortíz, que aún sin tener relación directa con el tema, mostraron gran compromiso y me ayudaron en la etapa de determinación de rendimiento de tomates y de observación de patógenos.

Al todo el “piso 6” compañeros de trabajo, amigos entrañables pero, sobre todo científicos que me enseñan y transmiten el amor por esta profesión.

Mis amigas y compañeras abejolólogas de siempre, no hay palabras para decir lo que me enseñan y acompañan, Estela Santos y Natalia Arbulo.

Especialmente quiero agradecer a Ciro, tutor y amigo, que hace catorce años me guía en esta profesión pero sobretodo por su compañerismo y amistad, gracias!!!

A toda mi familia por siempre apoyarme. ¡A mis padres, gracias!

A *Diego*, compañero incondicional que siempre está!  
A *Patricio y Juana*,  
por darme todo lo que necesito para ser feliz, son mi mayor logro.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
I. _____ PÁGINA DE APROBACIÓN	2
II. _____ AGRADECIMIENTOS .....	4
III. _____ RESUMEN .....	9
IV. _____ SUMMARY .....	12
1. _____ INTRODUCCIÓN .....	15
1.1. IMPORTANCIA DE LA POLINIZACIÓN ENTOMÓFILA .....	15
1.2. ABEJORROS DEL GÉNERO BOMBUS .....	17
1.3. PRINCIPALES PARÁSITOS Y PATÓGENOS DE LOS ABEJORROS .....	20
1.3.1. <u>Microsporidios: <i>Nosema spp</i> y <i>Tubilonosema pampeana</i></u> .....	21
1.3.2. <u>Nematodos</u> .....	23
1.3.3. <u>Dípteros parasitoides</u> .....	24
1.3.4. <u>Ácaros</u> .....	25
1.3.5. <u>Virus</u> .....	26
1.4. LOS ABEJORROS COMO POLINIZADORES.....	27
1.5. CULTIVOS QUE PODRÍAN BENEFICIARSE POR LA POLINIZACIÓN DE ABEJORROS NATIVOS EN URUGUAY.....	29
1.5.1. <u>Trébol rojo</u> .....	29
1.5.2. <u>Tomate</u> .....	33
2. <u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u> .....	37
3. <u>OBJETIVOS</u> .....	38
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
4. <u>CAPITULO 1. POLINIZACIÓN EN TRÉBOL ROJO (<i>TRIFOLIUM PRATENSE</i>) CON ABEJORROS <i>BOMBUS ATRATUS</i></u>	40
4.1. INTRODUCCIÓN .....	40
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
4.2.1. <u>Aspectos generales</u> .....	41
4.2.2. <u>Instalación y evaluación de los nidos de abejorros</u> .....	41
4.2.3. <u>Demarcación de las parcelas de observación en el semillero</u> .....	41
4.2.4. <u>Instalación de carpas experimentales</u> .....	43
4.2.5. <u>Evaluación del tamaño de las colonias de abejorros</u> .....	43
4.2.6. <u>Ritmo de actividad de los abejorros</u> .....	44
4.2.7. <u>Colecta de polen corbicular y néctar</u> .....	44
4.2.8. <u>Determinación del origen botánico de las muestras de polen y néctar</u> .....	45
4.2.8.1. Preparación de las muestras de polen y néctar.....	46
4.2.8.2. Identificación del origen botánico de las muestras...	46

4.2.9. <u>Presencia de los abejorros y otros polinizadores en el semillero</u> .....	46
4.2.10. <u>Cuantificación del volumen de néctar en flores de trébol rojo</u> .....	47
4.2.11. <u>Rendimiento de semillas</u> .....	48
4.2.12. <u>Análisis Estadísticos</u> .....	48
4.3. RESULTADOS .....	49
4.3.1. <u>Evolución de las colonias de abejorros</u> .....	50
4.3.2. <u>Ritmo de actividad de los abejorros</u> .....	50
4.3.3. <u>Evolución de la floración de trébol rojo</u> .....	52
4.3.4. <u>Volumen de néctar en las flores de trébol rojo</u> .....	53
4.3.5. <u>Origen botánico de las muestras de polen y néctar</u> .....	54
4.3.6. <u>Presencia de abejorros y abejas melíferas en el semillero</u> .....	55
4.3.7. <u>Presencia de otros polinizadores en el semillero</u> .....	59
4.3.8. <u>Rendimiento de semillas</u> .....	62
4.3.9. <u>Relación entre el rendimiento de semillas y presencia de abejorros</u> .....	65
4.3.10. <u>Producción de semillas en las carpas</u> .....	67
4.4. DISCUSIÓN.....	69
4.4.1. <u>Evolución de las colonias de abejorros</u> .....	70
4.4.2. <u>Ritmo de actividad de los abejorros</u> .....	70
4.4.3. <u>Utilización de recursos botánicos</u> .....	72
4.4.4. <u>Presencia de los abejorros y abejas melíferas en el semillero</u> .....	72
4.4.5. <u>Presencia de otros polinizadores</u> .....	73
4.4.6. <u>Rendimiento de semillas</u> .....	74
4.4.6.1. En las parcelas .....	75
4.4.6.2. En las carpas .....	75
4.4.6.3. Consideraciones finales .....	77
5. <u>CAPÍTULO 2. POLINIZACIÓN EN TOMATE (SOLANUM LYCOSPERSICUM) UTILIZANDO ABEJORROS NATIVOS (BOMBUS ATRATUS) COMO POLINIZADORES EN CULTIVO BAJO INVERNÁCULO.</u> .....	80
5.1. INTRODUCCIÓN. ....	82
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	82
5.2.1. <u>Aspectos generales</u> .....	82
5.2.2. <u>Experimento 1</u> .....	82
5.2.3. <u>Experimentos 2 y 3</u> .....	84
5.2.4. <u>Análisis estadísticos</u> .....	87
5.3. RESULTADOS .....	87
5.3.1. <u>Experimento 1</u> .....	87
5.3.2. <u>Experimento 2</u> .....	88
5.3.3. <u>Experimento 3</u> .....	89
5.3.4. <u>Correlación entre número de semillas y peso</u> .....	92
5.5. DISCUSIÓN.....	93

6. <u>CAPÍTULO 3. EFECTO DE LA POLINIZACIÓN DE TOMATE CON ABEJORROS EN EL RENDIMIENTO Y LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS FRUTOS.</u> .....	96
6.1. INTRODUCCIÓN. ....	98
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	98
6.2.1. <u>Aspectos generales</u> .....	99
6.2.2. <u>Rendimiento de tomate</u> .....	101
6.2.3 <u>Análisis estadísticos</u> .....	101
6.3. RESULTADOS .....	103
6.3.1. <u>Actividades de los abejorros</u> .....	103
6.3.2. <u>Rendimiento de tomates por plantas</u> .....	103
6.3.3. <u>Rendimiento de tomates en las parcelas</u> .....	104
6.3.4. <u>Textura y contenido de azúcares de los tomates</u> .....	104
6.4. DISCUSIÓN.....	105
6.4.1. <u>Actividades de los abejorros</u> .....	107
6.4.2. <u>Rendimiento de tomates por plantas</u> .....	109
6.4.3. <u>Rendimiento de tomates en las parcelas</u> .....	109
6.4.4. <u>Textura y contenido de azúcares de los tomates</u> .....	111
6.4.5. <u>Consideraciones finales</u> .....	111
	112
7. <u>CAPÍTULO 4. IDENTIFICACION DE LOS PATÓGENOS INTERNOS, EXTERNOS Y VIRUS EN ABEJORROS <i>B. ATRATUS</i></u>	114
7.1. INTRODUCCIÓN.....	118
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	120
7.2.1. <u>Colecta de abejorros</u> .....	
7.2.2. <u>Identificación de parásitos internos y ácaros</u> .....	
7.2.3. <u>Análisis de virus ARN</u> .....	
7.2.3.1. <u>Extracción de ARN y RT – qPCR</u> .....	
7.2.4. <u>Análisis de datos</u> .....	
7.3. RESULTADOS.....	
7.3.1. <u>Patógenos internos</u> .....	
7.3.2. <u>Parásitos</u> .....	
7.3.3. <u>Parasitoides</u> .....	
7.3.4. <u>Ácaros foréticos</u> .....	
7.3.5. <u>Virus ARN</u> .....	
7.4. DISCUSIÓN.....	
7.4.1. <u>Patógenos internos</u> .....	
7.3.2. <u>Parásitos</u> .....	
7.3.3. <u>Parasitoides</u> .....	
7.3.4. <u>Ácaros foréticos</u> .....	
7.3.5. <u>Virus ARN</u> .....	
7.3.6. <u>Consideraciones finales</u> .....	
8. CONCLUSIONES .....	
9. PERSPECTIVAS.....	
10. BIBLIOGRAFÍA.....	

## I. RESUMEN

El servicio ecosistémico que brindan los insectos polinizadores está en riesgo debido a la amenaza de sus poblaciones en buena parte del mundo. Esta “crisis de polinizadores” tendría consecuencias importantes en el mantenimiento de los ecosistemas naturales y la producción agropecuaria.

Los abejorros del género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae), abejas primitivamente eusociales de ciclo anual, son ampliamente reconocidos como polinizadores eficientes de muchos cultivos. Su empleo como polinizadores se ha visto facilitado por la obtención de colonias mediante cría artificial en algunas especies. En Uruguay están presentes dos especies nativas, *Bombus atratus* distribuida en todo el país, y *Bombus bellicosus*, localizada principalmente al sur del Rio Negro.

En esta tesis se estudió la eficacia de *B. atratus* como polinizador del trébol rojo (*Trifolium pratense*) y del tomate (*Solanum lycopersicum*) en invernáculo, y se identificaron los principales parásitos y virus que afectan a esta especie.

Para polinizar un semillero de de trébol rojo en su primera floración (diciembre-enero) se emplearon colonias de abejorros *B. atratus* obtenidas mediante cría artificial. Los abejorros visitaron el trébol rojo mostrando un claro gradiente decreciente de distribución desde la ubicación de los nidos. A

lo largo del periodo de floración el trébol rojo estuvo presente en las muestras de polen corbicular en una proporción entre 32 % y 52 %, y en las muestras de néctar en una proporción entre 19 % y 52 %. El rendimiento promedio de semillas a 10, 80 y 160 metros de los nidos fue de 709, 423, 327 kg/ha, respectivamente, mientras que el porcentaje de cuajado fue de 42,7 %, 30,2 % y 25,7 %, respectivamente. Las abejas melíferas estuvieron muy presentes en el semillero, sin embargo, correlacionando la producción de semillas con la presencia de los abejorros mediante un Modelo General Lineal se pudo determinar que éstos últimos fueron responsables de la producción de casi 400 kg/ha de semillas. Los valores de rendimiento de semillas en la cercanía de los nidos fueron significativamente mayores a los que se obtienen normalmente polinizando la leguminosa con abejas melíferas, lo que abre la posibilidad mejorar la producción nacional de semillas mediante el empleo de abejorros como polinizadores.

Se realizaron tres experiencias de polinización de tomate para evaluar el efecto de los abejorros nativos *B. atratus* en el porcentaje de cuajado, peso, diámetro, número de semillas y número de lóculos de tomate (variedades LAPATAIA y ELPIDA). Se realizó una experiencia en el departamento de Canelones donde se cotejaron los frutos de flores polinizadas por abejorros y flores no visitadas por los insectos, y dos experiencias en Salto iguales a la de Canelones pero incluyendo flores tratadas con hormonas. En los tres invernáculos la visita de los abejorros a las flores incrementó el porcentaje de cuajado entre 13 y 47 % en relación al obtenido en flores no visitadas por los insectos. La acción polinizadora de los abejorros también mejoró significativamente el peso, tamaño y número de semillas respecto a frutos obtenidos de flores sin acceso a polinizadores en dos de las tres experiencias realizadas. Por otro lado, en las dos variedades de tomate se encontró una correlación positiva entre el número de semillas y el peso ( $R^2=0,37$ ,  $R^2=0,53$  para las variedades LAPATAIA y ELPIDA, respectivamente). Este estudio es el primero en Uruguay que muestra los

beneficios de utilizar abejorros nativos para mejorar la producción de tomates en invernáculos.

El análisis exhaustivo de reinas, obreras de nidos silvestres y obreras obtenidas mediante cría artificial permitió identificar los microsporidios *Nosema ceranae* y *Tubilonosema pampeana*, un díptero de la familia Conipidae, el nematodo *Sphaerularia bombi*, los ácaros foréticos *Tyrophagus putrescentinae*, *Pneumolaelaps longanalis*, *Pneumolaelaps longipilus*, *Kuzinia* spp. y *Parasitellus fucorum*, el Virus de las alas deformadas (DWV), el Virus de las celdas negras de la reina (BQCV), el Virus de la cría ensacada (SBV) y el Virus de la parálisis aguda (ABPV). La prevalencia de *N. ceranae* fue mayor en las obreras capturadas en el campo (45,9 %) que en las obreras obtenidas en el laboratorio (13,0 %) y en las reinas (16,6 %). Las larvas de Conipidae se hallaron solo en las obreras de campo (16,2%) y en las reinas (10,5 %). El nematodo *S. bombi* solo se halló en reinas con una prevalencia baja (10,5 %). El grupo con mayor prevalencia de ácaros fueron las reinas (73,6 %), seguidos por las obreras de laboratorio (65,2%) y las obreras de campo (40,5%). En las reinas se presentó la mayor diversidad de especies de ácaros, el 64,3 % presentaron más de una especie. En el 82,4% de los abejorros analizados se detectó por lo menos un virus ARN siendo el BQCV el más prevalente apareciendo en el 80,9% de las muestras, con una amplia diferencia con respecto a los demás. Solo para el virus DWV se hallaron diferencias entre los tres grupos de abejorros estudiados, siendo más prevalente en las obreras de campo. Las reinas aparecen como el integrante de las colonias más expuesto a los parásitos, especialmente los ácaros. Las colonias de abejorros son de ciclo anual, y solo las reinas sobreviven en invierno. Esta característica ha moldeado el comportamiento de los parásitos para reproducirse y propagarse superando el periodo en que las colonias desaparecen. El confinamiento de las obreras durante la cría artificial y la disponibilidad de abundante alimento no parecen generar condiciones adversas importantes desde el punto de vista sanitario.

Los resultados de esta tesis constituyen un aporte a la producción agropecuaria nacional, al demostrar que el abejorro nativo *B. atratus* es un eficiente polinizador de dos cultivos de mucha importancia económica. También se brinda información exhaustiva sobre los parásitos y virus presentes en esta especie y el potencial daño que podría causar en poblaciones naturales o durante su cría artificial.

Palabras claves: polinización, abejorros nativos, trébol rojo, tomate.

## II. SUMMARY

The ecosystem service provided by insect pollinators is at risk due to the threat to their populations in the most parts of the world. This "pollinator crisis" would have important consequences in the maintenance of natural ecosystems and agricultural production.

Bumblebees of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae), primitively eusocial bees with annual life cycle, are widely recognized as efficient pollinators of many crops. Its use as pollinators has been facilitated by obtaining colonies by artificial rearing in some species. In Uruguay, two native species are present, *Bombus atratus* distributed throughout the country and *Bombus bellicosus* located mainly south of the Rio Negro.

In this thesis, the efficiency of *B. atratus* as pollinator of red clover (*Trifolium pratense*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) was studied, and the main parasites and viruses affecting this species were identified.

To pollinate a red clover seedset in its first bloom (December-January), *B. atratus* colonies obtained by artificial rearing were used. Bumblebees visited the red clover showing a clear decreasing distribution gradient from the nest location. Throughout the flowering period, the red clover was present

in the bumblebees' corbicular pollen samples in a proportion between 32 % and 52 % and in the bumblebees' nectar samples in a proportion between 19 % and 52 %. The average seed yield at 10, 80 and 160 meters from the nests was 709, 423, 327 kg/ha, respectively; while the percentage of fruit set was 42.7 %, 30.2 % and 25.7 % respectively. Honey bees were very abundant in the seedbed, however, by correlating seed production with the presence of bumblebees by means of a General Linear Model, it was determined that the latter were responsible for the production of almost 400 kg/ha of seeds. Seed yield values near the nests were significantly higher than those normally obtained by pollinating the legume with honey bees, which opens the possibility of improving national seed production by using bumblebees as pollinators.

Three tomato pollination experiences were conducted to evaluate the effect of native bumblebees *B. atratus* on the percentage of fruit set and several fruit characteristics: weight, diameter, number of seeds and number of locules (LAPATAIA and ELPIDA varieties were used). An experience was made in Canelones department, in which the fruits of flowers pollinated by bumblebees and flowers not visited by insects were compared, and two similar experiences in Salto but also including flowers treated with hormones. In the three greenhouses, bumblebee visits to flowers increased the percentage of fruit set between 13 and 47 % in relation to that obtained in flowers not visited by insects. The pollinator action of bumblebees also significantly improved fruit weight, size and number of seeds with respect to fruits obtained from flowers without access to pollinators in two of the three experiences. On the other hand, in the two tomato varieties a positive correlation was found between the number of seeds and fruit weight ( $R^2=0.37$ ,  $R^2=0.53$  for the varieties LAPATAIA and ELPIDA, respectively). This study is the first in Uruguay that shows the benefits of using native bumblebees to improve tomatoes production in greenhouses.

The exhaustive analysis of queens, workers from wild nests and workers obtained by artificial rearing/breeding allowed to identify the microsporidia

*Nosema ceranae* and *Tubilonosema pampeana*, a diptera of the family Conipidae, the nematode *Sphaerularia bombi*, the phoretic mites *Tyrophagus putrescentinae*, *Pneumolaelaps longanalis*, *Pneumolaelaps longipilus*, *Kuzinia* spp. And *Parasitellus fucorum*, the Deformed Wing Virus (DWV), the Black Queen Cell Virus (BQCV), the Sacbrood Virus (SBV) and the Acute Paralysis Virus (ABPV). The prevalence of *N. ceranae* was higher in the workers captured in the field (45.9%) than in the workers obtained in the laboratory (13.0 %) and the queens (16.6 %). Conipidae larvae were found only in field workers (16.2 %) and queens (10.5 %). The *S. bombi* nematode was only found in queens with a low prevalence (10.5 %). The group with the highest prevalence of mites were queens (73.6 %), followed by laboratory workers (65.2 %) and field workers (40.5 %). In the queens there was the greatest diversity of mite species, 64.3% presented more than one species. In 82.4 % of the bumblebees analyzed, at least one RNA virus was detected, with BQCV being the most prevalent appearing in 80.9 % of samples, with a wide difference from the others. Solo para el virus DWV se hallaron diferencias entre los tres grupos de abejorros estudiados, siendo más prevalente en las obreras de campo. Only for the DWV differences were found between the three groups of bumblebees studied, being more prevalent in field workers. The queens appear as the colony member most exposed to parasites, especially mites. Bumblebee colonies have an annual cycle and only queens survive the winter. This characteristic has shaped the behavior of parasites to reproduce and spread exceeding the period in which colonies disappear. The confinement of workers during artificial rearing/breeding and the availability of abundant food do not seem to generate important adverse conditions from a sanitary point of view.

The results of this thesis constitute a contribution to the national agricultural production, demonstrating that the native bumblebee *B. atratus* is an efficient pollinator of two crops of great economic importance. Comprehensive information is also provided on the parasites and viruses

present in this species and the potential damage that could be caused in natural populations or during artificial rearing.

Key words: pollination, native bumblebees, red clover, tomato.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. IMPORTANCIA DE LA POLINIZACIÓN ENTOMÓFILA

La polinización es el proceso biológico que consiste en el movimiento de los granos de polen desde la parte masculina hacia la parte femenina de la flor, y por el cual las plantas angiospermas aseguran su reproducción. Este transporte puede ser realizado por diferentes agentes como el viento o el agua, pero en su gran mayoría está mediado por un animal, los que generalmente visitan las flores buscando algún recurso alimenticio. De esta forma, los polinizadores brindan un servicio ecosistémico, siendo este definido como un beneficio para el bienestar humano proporcionado por organismos que interactúan en el ecosistema (Klein *et al.*, 2007). El 90 % de las plantas con flor necesitan de los polinizadores, es por eso que son considerados especies claves, ya que de ellos depende el mantenimiento de las comunidades vegetales, la biodiversidad y los cultivos (Ashman *et al.*, 2004). Recientemente se señaló que la pérdida de polinizadores en las próximas décadas podría ser un factor crítico en la sostenibilidad de las poblaciones humanas (Chaplin-Kramer *et al.*, 2019).

Los polinizadores de mayor importancia son los insectos, y dentro de éstos se destacan las abejas de la superfamilia Apoidea (Hymenoptera) las que se alimentan exclusivamente del néctar y el polen de las flores. El néctar es una importante fuente de carbohidratos para los adultos y el polen, rico en proteínas, es el alimento indispensable en la etapa larval. Para satisfacer estos requerimientos alimenticios las abejas poseen estructuras especializadas (pelos ramificados y corbículas) para remover y coleccionar grandes cantidades de polen de las flores. Adicionalmente, hay varias especies sociales (abejas melíferas, abejas sin aguijón y abejorros) que viven en colonias numerosas, con sistemas de comunicación sofisticados y repartición de tareas que aumentan la eficiencia en la colecta de alimento, por lo que visitan numerosas flores contribuyendo a la polinización del 80 % de las angiospermas (Michener, 2007).

Más allá de la importancia ecológica que tienen los polinizadores, diversos estudios se han enfocado en su importancia a nivel de la producción agropecuaria, ya que el 35 % de los cultivos base de nuestra alimentación dependen de la polinización entomófila (Potts *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2007; Kearns *et al.*, 1998). Traduciendo esto en valor económico, un estudio basado en datos productivos de 2005, le atribuyó a la polinización entomófila la cifra de 215 billones de dólares, lo que representó un 10 % de la producción global ese año (Gallai *et al.*, 2009). Incluso los beneficios económicos son mayores si incluimos aquellos cultivos que ven mejorado sus rendimientos en cuanto a cantidad y calidad de fruto producido (Aizen *et al.*, 2009). A nivel nacional se determinó que un 77 % de los 3,5 millones de dólares de la producción hortícola en el año 2012 podrían ser atribuidos a las abejas *Apis mellifera*. Este valor se calculó a partir de cultivos en los que existe una dependencia a la polinización entomófila la cuál es atendida mediante la utilización de abejas melíferas (Santos *et al.*, 2014). Considerando que existen diversas especies de abejas nativas con capacidades polinizadoras diferentes de acuerdo a los cultivos evaluados, el

valor total que representaría la acción de los polinizadores en la producción agrícola en Uruguay seguramente sea mayor.

Desde hace algunos años se vienen reportando pérdidas de poblaciones de abejas melíferas, abejorros del género *Bombus* y otros insectos polinizadores, advirtiendo las consecuencias ecológicas y productivas que ésta podría acarrear (Geldmann y González-Varo, 2018; Vanbergen *et al.*, 2013; Lautenbach *et al.*, 2012; Bommarco *et al.*, 2011; Neumann y Carreck, 2010). Esta situación fue denominada por la FAO como “crisis de polinizadores” (FAO, 2018), la cual está dada por diversas causas que actúan sinérgicamente y que están estrechamente asociadas a la actividad humana (Kearns *et al.*, 1998). Las más destacadas tienen que ver con los cambios en el uso del suelo donde predomina el sistema de producción de monocultivo, la pérdida y fragmentación de los hábitats, la utilización excesiva de agroquímicos, la competencia con especies exóticas y una mayor susceptibilidad a parásitos y patógenos (Goulson *et al.*, 2015; Cameron *et al.*, 2011; Goulson, 2010; Potts *et al.*, 2010; Williams y Osborne, 2009).

## 1.2. ABEJORROS DEL GÉNERO BOMBUS

Los abejorros pertenecientes al género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) son abejas primitivamente eusociales con un ciclo anual (Michener, 2007). Las jóvenes reinas fecundadas emergen de la hibernación al comienzo de la temporada cálida y cada una funda una nueva colonia anidando generalmente en cavidades o depresiones en o cerca de la superficie del suelo. Al principio la reina realiza las tareas de construcción del nido. En condiciones normales la primera camada, así como varias subsiguientes, está formada exclusivamente por obreras las cuales realizan todas las actividades de mantenimiento, aprovisionamiento del nido y cuidado de la cría (Michener, 2007; Goulson, 2003) (Figura 1). Desde el momento que emergen las primeras obreras la reina se dedica exclusivamente a poner huevos, aunque también participa en el cuidado de

la cría. Las colonias continúan su crecimiento y desarrollo hasta que, por lo general a principios de otoño, ocurre un cambio en la producción de obreras hacia la producción de reproductores (machos y reinas). Los machos abandonan el nido pocos días después de emerger, buscan pareja, se aparean y mueren. Las jóvenes reinas luego del apareamiento acumulan reservas y buscan un lugar resguardado y seco bajo tierra para hibernar. En algunos casos, antes de comenzar la hibernación, pueden permanecer por un tiempo en el nido cumpliendo con las tareas comunes a las obreras, incluyendo la actividad de forrajeo. En otoño la reina vieja muere, y paulatinamente también lo hacen las obreras finalizando así el ciclo de la colonia (Heinrich, 2004; Goulson, 2003; Free, 1993; Michener, 1974).

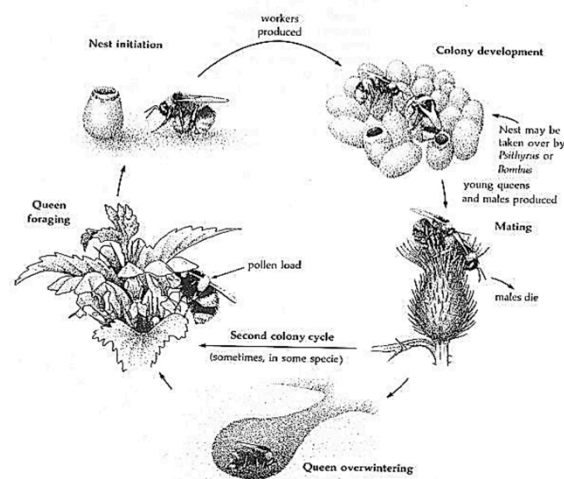


Figura 1. Ciclo de vida de los abejorros del género *Bombus*. Tomado de Goulson (2010).

El género *Bombus* representa el único taxón genérico de la tribu Bombini, constituido por 239 especies (Michener, 2007), las que se encuentran ampliamente distribuidas en las regiones Holártica, Oriental y Neotropical del mundo (Cameron y Williams, 2003). En la región Holártica se destacan por su abundancia y diversidad, mientras que en la región Neotropical han sido citadas sólo 42 especies en una gran variedad de ambientes, desde el nivel del mar hasta los 4.400 metros en los Andes

(Abrahamovich *et al.*, 2005; Abrahamovich y Díaz, 2002). De las 24 especies reportadas en América del Sur, Uruguay cuenta con la presencia de *Bombus atratus* (Friese) (syn *Bombus pauloensis* (Franklin)) (Moure y Melo, 2012; Franklin, 1912) y *Bombus bellicosus* Smith (Santos *et al.*, 2017).

*Bombus atratus*, es una de las especies que posee mayor distribución en toda América del Sur (Abrahamovich *et al.*, 2005), llegando a ser abundante en todo el territorio uruguayo (Santos *et al.*, 2017). Esta especie tiene la particularidad de presentar polimorfismo cromático observándose una forma melánica totalmente negra, y una forma flavínica, con una base negra y bandas amarilla en tórax y abdomen (Abrahamovich *et al.*, 2005; Salvarrey, 2019). *Bombus bellicosus*, por su parte, tiene una distribución más restringida al sur del Río negro, posee una coloración negra y presenta la superficie dorsal del tórax provisto de gruesos pelos amarillos y la punta del abdomen de color cobre (Abrahamovich *et al.*, 2004) (Figura 2).

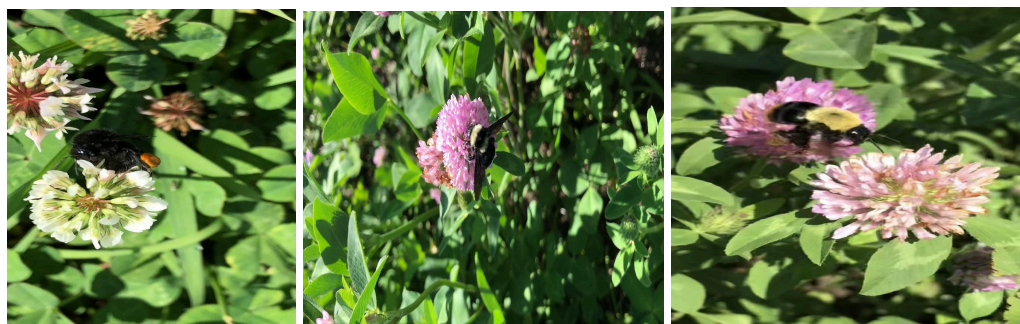


Figura 2. Especies de abejorros nativos presentes en Uruguay. *Bombus atratus*, forma melánica (izquierda) y flavínica (centro), y *Bombus bellicosus* (derecha).

Considerando las diversas ventajas que poseen los abejorros como polinizadores y su potencial uso en cultivos comerciales, desde el siglo pasado se comenzó a profundizar en la biología y comportamiento de numerosas especies con el fin de utilizar sus colonias para mejorar los rendimientos de cultivos (Velthuis y van Door, 2006; Velthuis, 2002). Esto llevó al desarrollo de la técnica de cría en cautiverio, lo que brindó la ventaja de desestacionalizar el ciclo natural de las colonias y concretar su utilización

en cualquier momento del año. A fines de los '80 se inicia la comercialización de colonias de abejorros para la polinización de tomate en invernáculo, principal cultivo en el que son utilizados hasta la actualidad (Velthuis y van Door, 2006; Velthuis, 2002). Por diversas razones el uso de abejorros para polinizar dicho cultivo fue económicamente rentable y rápidamente la comercialización de colonias se fue expandiendo (Velthuis y van Doorn, 2006).

En la actualidad las colonias de abejorros se comercializan en todo el mundo tanto para cultivos en invernadero como a campo (Velthuis y van Doorn, 2006; Matheson, 1996) empleando especies europeas, norteamericanas y en menor medida, sudamericanas (Salvarrey *et al.*, 2013; Gennari, 2012; Torres y Gómez, 2009; Estay, 2007; Ruz, 2002). La especie de abejorro más comercializada, es *Bombus terrestris* de origen euroasiático, que ha sido introducida fuera de su rango geográfico natural llegando a instalarse en diversos países del mundo, incluyendo dentro de la región a Chile y Argentina (Velthuis y van Doorn, 2006; Ruz, 2002; Estay *et al.*, 2001).

De acuerdo a la forma de alimentar las larvas, *B. atratus* y *B. bellicosus*, pertenecen al grupo "hacedores de bolsillo" (*pocket makers*), característica que hace que estas especies sean más difíciles de criar en cautiverio (Ptacek y Drobna, 2006; Velthuis y van Doorn, 2006). Aún así, años atrás se realizaron experiencias exitosas de cría en varios países de la región como Argentina (Gennari, 2012), Brasil (Garófalo, 1979), Colombia (Aldana *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2008) y en Uruguay (Salvarrey *et al.*, 2013). En la actualidad hay una comercialización de colonias de *B. atratus* por parte de la empresa Brometan (Argentina), la que abastece a algunos productores de tomates en Uruguay, en una práctica comercial aún incipiente.

### 1.3. PRINCIPALES PARÁSITOS Y PATÓGENOS DE LOS ABEJORROS

Existen diferentes parásitos y patógenos como virus, bacterias, hongos, protozoarios, nemátodos, microhimenópteros y dípteros parasitoides y

ácaros que afectan a los abejorros (Schmid-Hempel, 2001). Muchos de ellos cumplen una función natural de regular las poblaciones. Sin embargo, la introducción de parásitos no-nativos tiene potencialmente efectos dramáticos sobre las poblaciones (Daszak *et al.*, 2000).

Las poblaciones de abejorros, al igual que la de las abejas melíferas *A. mellifera* y la de otros ápidos polinizadores, están siendo amenazadas en muchas regiones del mundo por diferentes factores, lo que podría tener consecuencias negativas en la producción agrícola y el mantenimiento de los ecosistemas naturales (Potts *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2007; Goulson, 2003). Entre estas amenazas se destacan diferentes grupos de parásitos, patógenos y virus, algunos específicos del género *Bombus* y otros compartidos con otros grupos de insectos (Manley *et al.*, 2015; Daszak *et al.*, 2000). El extenso comercio y movimiento de abejas melíferas y en menor medida algunas especies de *Bombus* (ej. *B. terrestris*) ha provocado la dispersión de patógenos a nuevas regiones donde anteriormente no se encontraban, fenómeno conocido como “derrame de patógenos” (*spillover*) (Graystock *et al.*, 2015; Daszak *et al.*, 2000). El movimiento de patógenos ya sea a nivel intraespecífico como interespecífico puede afectar las poblaciones de abejas.

Uno de los ejemplos más claros de *spillover* es el del microsporidio *Nosema ceranae*, que se encuentra presente en abejas melíferas (Higes *et al.*, 2010), abejorros (Li *et al.*, 2012; Arbulo *et al.*, 2015), abejas sin aguijón (Freitas, 2009; Porrini *et al.*, 2017), abejas solitarias (Euglossini) (Nemésio, 2009) y avispas sociales (Porrini *et al.*, 2017). Otro ejemplo son los virus ARN más conocidos de las abejas melíferas, Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Deformed Wing Virus (DWV) y Sacbrood Virus (SBV), que también se encuentran en abejorros (Alger *et al.*, 2019; Gamboa *et al.*, 2015), abejas sin aguijón (Alvarez *et al.*, 2018; Ueira-Viera *et al.*, 2015), algunas especies silvestres solitarias como *Xylocopa augusti* (en la que se detectó DWV) (Lucia *et al.*, 2014) y en otros

insectos polinizadores como mariposas del orden Lepidoptera (Levitt *et al.*, 2013) y en sírfidos (Diptera) (Bailes *et al.*, 2018).

Poco se sabe de los diferentes patógenos, parásitos y virus que afectan directamente a los abejorros, pero en la actualidad se han reportado numerosos grupos y especies que están afectando las poblaciones de especies nativos en América del Sur.

#### 1.3.1. Microsporidios: *Nosema spp* y *Tubilonosema pampeana*.

Entre los microsporidios que parasitan insectos se destacan las especies del género *Nosema* por las enfermedades que causan a una amplia variedad de especies como el gusano de seda, varias plagas agrícolas, abejas melíferas y abejorros (Solter, 2008). Dentro del grupo Apidae (abejas corbiculadas) se han identificado tres especies del género *Nosema apis*, *Nosema bombi* y *N. ceranae* (Michener, 2007).

Las esporas de *Nosema spp.* ingresan al hospedero vía oral e infectan las células epiteliales del intestino, dependiendo de la especie del patógeno pueden extender la infección a otros tejidos. Las esporas germinan en el intestino e inyectan el esporoplasma dentro de las células epiteliales a través del filamento polar. En la célula ocurre la multiplicación del microsporidio hasta que las esporas maduran y son liberadas a la luz del intestino por lisis celular. Las esporas maduras son eliminadas con las heces o pueden re-infectar células vecinas.

Inicialmente la presencia de nosemosis se determinó mediante la detección de esporas en el microscopio óptico, basándose en las diferencias en forma y tamaño de las esporas de *N. apis*, *N. bombi* y *N. ceranae*. La espora de *N. ceranae* de forma oval suelen ser más pequeñas que *N. apis*, que suele ser más cilíndrica (Huang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005). Por su parte las esporas de *N. bombi* son altamente variables en tamaño y forma (redondeadas, ovals, alargadas) (Li *et al.*, 2005). Dado los casos de co-infección de más de una especie de microsporidios, en la actualidad se utilizan análisis moleculares que son más especializados para discriminar las

especies de *Nosema*. Estas técnicas basadas en las diferencias genéticas logran resultados más rigurosos, que han permitido constatar la presencia de *N. ceranae*, cuyo hospedero natural es la abeja asiática *Apis cerana* en *A. mellifera* (Paxton *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2006), y en algunas especies de abejorros euroasiáticas como *B. terrestris* y sudamericanas *B. atratus*, *B. morio*, *B. bellicosus* (Plischuk *et al.*, 2009; Arbulo *et al.*, 2015).

Adicionalmente, Plischuk *et al.* (2015) describieron un nuevo microsporidio infectando individuos de *B. atratus* en Argentina. A dicho patógeno se le adjudicó el nombre de *Tubilonosema pampeana* luego de constatar genéticamente que pertenece familia Tubilonosematidae. Tras la disección de abejorros se observó que la gran mayoría de los individuos infectados presentaban alteraciones en el tejido adiposo, que consistían en agrandamientos en forma de quistes. Se comprobó que este microsporidio infectaba el tejido adiposo, los túbulos de Malpighi y las células musculares; el tejido neural, el tracto digestivo y el tejido conectivo también se encontraban infectados, pero con menos frecuencia. No se encontraron infecciones en las gónadas (Plischuk *et al.*, 2015).

Los microsporidios afectan principalmente las funciones digestivas de sus huéspedes con consecuencias en la fisiología (desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad) y el comportamiento (irregularidades en la repartición de tareas, disminución de vuelo, reducción en la detección y manejo de las flores durante el pecoreo) (Higes *et al.*, 2013; Gegear *et al.*, 2006; Fries, 1996). Específicamente, en abejorros se ha reportado una importante reducción en la producción de nuevos reproductores y una alta mortandad en períodos posteriores a la infección (Graystock *et al.*, 2013b). Con esto, la afección causada por los microsporidios es señalada como una de las causas más importantes que amenazan las poblaciones de abejorros (Brown, 2017; Graystock *et al.*, 2016).

### 1.3.2. Nematodos

Uno de los parásitos más conocidos en abejorros es el nematodo *Sphaerularia bombi*. El ciclo de vida comienza con una hembra de nematodos apareada que ingresa a la reina de abejorro a través del intestino o la cutícula mientras ésta está hibernando en el suelo, y se instala en el hemocele. El útero del nematodo puede evertirse mientras la reina todavía está hibernando o después de que sale de la hibernación, llegando a su tamaño máximo (hasta 2 cm de largo) en el plazo de una semana (Goulson, 2003; Poinar y Van der Laan, 1972). El huésped puede albergar múltiples individuos. La hembra de *S. bombi* pone huevos que rápidamente crecen dando lugar a numerosas larvas (100.000). Uno de los aspectos más intrigantes de este parásito es su capacidad para influir en el comportamiento de su huésped inhibiendo la liberación de hormonas que estimulan el desarrollo de los ovarios. La reina parasitada en lugar de buscar lugar para anidar y formar una colonia investiga los sitios de hibernación y los contamina con parásitos (Goulson, 2003). Las reinas que permanecen volando al final de temporada generalmente están infectadas, ya que las reinas sanas ya han fundado su nido en esta etapa. Las reinas huésped se vuelven cada vez más perezosas y finalmente mueren en la primavera o al comienzo del verano.

Este nematodo tiene gran incidencia en el éxito de cría en cautiverio, ya que al estar presente en una reina no permite que ésta desarrolle el nido (Plischuk y Lange, 2012).

### 1.3.3. Dípteros parasitoides

Dentro de los dípteros parasitoides, las moscas que pertenecen a la familia Conopidae son las más comunes asociadas con los abejorros (Goulson, 2003). Los miembros de otras familias como Tachinidae, Phoridae, Sarcophagidae y Calliphoridae también han sido reportados parasitando otras especies de *Bombus* (Knutson y Murphy, 1990).

El ciclo de vida de los conopidos está descrito por Alford (1975). El adulto vuela sobre la flor y espera a una abeja forrajera e inserta un solo

huevo a través de la membrana del intersegmento dentro del abdomen de su huésped. Una vez adentro del éste el huevo del parasitoide crece rápidamente. La larva consume la hemolinfa durante los primeros dos estadios, pero al tercero y último estadio cambia de alimentación y comienza a alimentarse de tejidos del abdomen y del tórax. La muerte del hospedero se da cerca de los 10-12 días después de la infección (Schmid-Hempel, 2001). Su presencia puede generar respuestas anormales en el huésped, como patrones de alimentación alterados y pasar la noche afuera, lo que también afecta la capacidad de coleccionar néctar para la colonia (Schmid-Hempel y Schmid-Hempel, 1991).

Una de las especies más conocida es *Physocephala nervosa*, la cual se ha registrado en varias especies de abejorros (Goulson, 2003). Los conocimientos sobre especies de dípteros sudamericanas de *Bombus* son pocos, limitados a los descritos por DeSantis (1989), Lucía *et al.* (2013), Abdalla *et al.* (2014) (Plischuk *et al.*, 2016). Específicamente Plischuk *et al.* (2016) encontraron en Uruguay la presencia de larvas de *P. nervosa* en *B. atratus* con una prevalencia de 1 a 8%.

#### 1.3.4. Ácaros

Existen al menos 15 géneros de ácaros asociados a los abejorros, dentro de éstos los más frecuentes son: *Pneumolaelaps*, *Parasitellus*, *Scutacarus*, *Hypoaspis* y *Kuzinia* (Revainera *et al.*, 2014; Rozéj *et al.*, 2012; Maggi *et al.*, 2011). La relación ácaro-abejorro está dada por la fosis, fenómeno que se da cuando un organismo utiliza a otro como medio de transporte y se diferencia del parasitismo porque en este caso el ácaro no se alimenta del “hospedero”. Los ácaros presentan poca movilidad y son muy pequeños por lo que les resulta fácil adherirse a un abejorro para dispersarse a nuevos hábitats (Evans, 1992).

Si bien no se alimentan de sus hospederos, el efecto de los ácaros sobre los abejorros es muy debatido. Muchos grupos se alimentan de ceras y polen y otros de pequeños nematodos y hongos por lo que serían

beneficiosos para los abejorros. Sin embargo, hay reportes que presentan a los ácaros como una de las explicaciones de la disminución de poblaciones de abejorros, mostrándolos como un agente de infección que facilitan la introducción de hongos y demás patógenos. Por otro lado, en su etapa forética pueden afectar las habilidades de vuelo y por lo tanto modificar el comportamiento de forrajeo de los individuos (Hubert *et al.*, 2003).

Dado sus hábitos alimenticios los ácaros están asociados con el estado sanitario de las colonias, las situaciones de confinamiento pueden favorecer la diversidad de ácaros y de patógenos que causen un impacto sobre el éxito de cría.

Las especies de ácaros encontradas sobre abejorros sudamericanos son las siguientes: *Kuzinia laevis*, *Kuzinia americana*, *Scutacarus acarorum*, *Pneumolaelaps longanalis*, *Pneumolaelaps longipilus*, *Tyrophagus putrescentinae*, *Parasitellus fucorum* y el ácaro traqueal: *Locustacarus bruchneri* (Plischuk *et al.*, 2016; Revainera *et al.*, 2014; Maggi *et al.*, 2011).

#### 1.3.5. Virus

Dentro de las causas que provocan la disminución de las poblaciones de polinizadores se destacan la presencia de diferentes virus infectando diferentes especies de ápidos. En este contexto han habido reportes de virus que originalmente estaban presentes en una especie de abeja y que luego se han encontrado en una nueva especie “blanco”. Tal es el caso reportado por Bailey y Gibbs (1964) detectaron infecciones del virus de la Parálisis aguda de las abejas (ABPV) en varias especies de abejorros. Adicionalmente, Genersch *et al.* (2006) identificaron el virus de las Alas deformadas (DWV) en aproximadamente el 10 % de reinas de *B. terrestris* en un criadero comercial. Una forma muy utilizada para estimular la ovoposición de la reina en condiciones de cautiverio es ponerles obreras de *A. mellifera*, esto puede ser una de las causas de la alta prevalencia de virus en reinas de cría.

En Uruguay *A. mellifera* presenta los siguientes virus: virus de las Alas deformadas (DWV), virus de las Celdas negras de la reina (BQCV), virus de la Cría ensecada (SBV), virus de la Parálisis aguda (ABPV) (Antúnez *et al.* 2006). Por otro lado, en Colombia Gamboa *et al.* (2015) han reportado la presencia de muchos de ellos infectando *B. atratus*. En Uruguay no hay información acerca de los virus presentes en las dos especies nativas de abejorros.

Ante el crecimiento en la utilización de colonias de abejorros de *B. atratus* se abre la necesidad de conocer como las condiciones de cría artificial, donde hay alta densidad de individuos, imposibilidad de salir al exterior a forrajear y abundante alimento, pueden incrementar la sobrevivencia y reproducción de diferentes patógenos, facilitando la proliferación y transmisión de enfermedades (Graystock *et al.*, 2013a; Murray *et al.*, 2013).

En Uruguay recientemente, se estudió la presencia de parásitos internos y externos en reinas, obreras y machos de ambas especies *B. atratus* y *B. bellicosus* (Revainera *et al.*, 2019; Plischuk *et al.*, 2016). En *B. atratus* la lista de parásitos internos incluyen a los microsporidios *N. ceranae* y *T. pampeana*, el nématodo *S. bombi* y una especie de díptero parasitoide (Plischuk *et al.*, 2016). Respecto a los ácaros externos se encontraron *Kuzinia* spp., *P. longanalis*, *P. longipilus*, *Scutacarus acarorum* y *T. putrescentiae* (Ravainera *et al.*, 2019).

Adicionalmente, la región más austral de Sudamérica (Argentina y Chile) se encuentra desde hace unos años especialmente amenazada por la dispersión de las especies exóticas, *B. terrestris* y *B. ruderatus*, introducidas en Chile en la década de los 80 (Morales *et al.*, 2013; Schmid-Hempel *et al.*, 2013). Por lo pronto, estas especies pudieron haber oficiado de reservorios de patógenos que saltaron a especies nativas ocasionando importantes daños en poblaciones naturales, como es el caso de *Bombus dahlbomii*, especie nativa de la zona andina de Chile y norte de Argentina que se encuentra en peligro de extinción (Schmid-Hempel *et al.*, 2014; Arbetman *et*

*al.*, 2012). Uruguay, país que limita con Argentina, no se encuentra libre de recibir a *B. terrestris* y *B. ruderatus*, o nuevos patógenos presentes en estas especies y dispersados por otras.

#### 1.4. LOS ABEJORROS COMO POLINIZADORES

Los abejorros han sido ampliamente reconocidos como excelentes polinizadores debido a que presentan numerosas características morfológicas y comportamentales que las hacen eficientes en diversos cultivos.

Entre esas características se destacan las siguientes:

- Cuerpos de tamaño grande con pelos gruesos y numerosos que les permite remover gran cantidad de polen (Goulson, 2003; Brodie, 1996).

- Probóscides largas, que le permiten forrajear en especies vegetales con flores de corolas profundas (Arbulo *et al.*, 2011; Heinrich, 2004; Goulson, 2003).

- Pueden trabajar a muy bajas temperaturas, lo que los hace esenciales polinizadores en zonas con clima templados y fríos donde se hace imposible la utilización de abejas melíferas (Goulson, 2003). Esta característica les permite también aumentar el horario diario de pecoreo (Estay *et al.*, 2001).

- Son capaces de realizar polinización por zumbido. Algunas plantas presentan anteras que liberan el polen en zonas muy limitadas (dehiscencia poricida), por lo que requieren un manejo especial para la obtención del mismo. Los abejorros al visitar las flores, posan el tórax sobre las anteras y contraen los músculos de vuelo produciendo una vibración o zumbido que permite la liberación del polen (Goulson, 2003). Este comportamiento especializado no lo poseen todas las abejas, razón por la cual los abejorros son polinizadores muy importantes para las plantas que poseen anteras con esta morfología particular. Entre éstas se encuentran las Solanáceas que incluyen especies cultivadas como el tomate (*Solanum lycopersicum*), algunas especies de Ericaceae y Boraginaceae y no puede ser llevado a

cabo con éxito por la mayoría de las abejas (Heinrich, 2004; Goulson, 2003; Kearns y Thomson, 2001; Free, 1993).

Dado las ventajas que representan estas características la utilización de abejorros para la polinización de cultivos de interés ha tomado gran protagonismo en la agricultura moderna (Velthuis y van Doorn, 2006; Heinrich, 2004; Goulson, 2003; Velthuis, 2002). Ambas especies de abejorros presentes en Uruguay utilizan un gran número de recursos florales entre los que se encuentran varios de interés productivo como lo son el trébol rojo (*Trifolium pratense*), una de las leguminosas forrajeras más utilizadas en el país, y el tomate (*Solanum lycopersicum*). Especialmente este último cultivo fue el que impulso la producción artificial y comercialización de colonias de abejorros en el mundo (Velthuis y van Doorn, 2006). En este sentido, dado los avances en la cría en condiciones controladas de colonias de ambas especies de abejorros nativos a nivel local (Salvarrey *et al.*, 2013), sumado a la comercialización de *B. atratus*, se abre la posibilidad de contar con ellas en programas de polinización.

## 1.5. CULTIVOS QUE PODRÍAN BENEFICIARSE POR LA POLINIZACIÓN DE ABEJORROS NATIVOS EN URUGUAY

En Uruguay hay numerosas especies de árboles frutícolas y leguminosas forrajeras que requieren de polinizadores eficientes. El uso de abejas melíferas suele ser suficiente para polinizar de forma eficiente buena parte de las especies (por ejemplo los manzanos (*Malus domestica*) y el lotus (*Lotus corniculatus*)). Sin embargo, dos cultivos de gran importancia económica como son trébol rojo (*Trifolium pratense*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*) en invernáculos tienen problemas de polinización con consecuencias económicas.

### 1.5.1. Trébol rojo

El trébol rojo (*Trifolium pratense*) es una de las leguminosas forrajeras más utilizadas en el mundo. Originaria de Europa, se ha naturalizado en América en regiones templado-frías y con elevados índices de humedad (Izaguirre y Beyhaut, 1997). Cultivado solo o en mezclas, se adapta a un amplio rango de condiciones climáticas, tipos de suelo y niveles de acidez (Palacio, 1987). En Uruguay se cultiva extensamente, siendo una de las especies de leguminosas preferidas para las praderas mixtas artificiales, sobre todo en la zona sur y litoral oeste del país (Izaguirre y Beyhaut, 1997).

Históricamente, nuestro país fue un gran importador de semillas de trébol rojo, tal es así que según datos de Instituto Nacional de Semillas de Uruguay entre los años 2005 y 2015 se utilizaron 11.609 toneladas de semillas de trébol rojo, de las cuales 33,8 % fueron importadas. La necesidad histórica de importar semillas de trébol rojo se debió en parte a que la producción de semillas se encaró generalmente como un rubro accesorio en la producción agropecuaria, ya que solo una pequeña fracción de los productores uruguayos la utilizaban como rubro principal (García *et al.*, 1991). A esto se agrega que el promedio nacional de producción de semilla de trébol rojo era durante los '90 de 119 kg/ha con un rango de 45 a 255 kg/ha, valores muy por debajo del potencial agrícola realizable de la especie que corresponde a 650 kg/ha (Formoso, 2010). En la actualidad, esta situación ha cambiado registrándose rendimientos más elevados a los valores históricos, tal es así que en los últimos tres años se han utilizado muchas más semillas de origen nacional (2.424 toneladas) que importadas (16 toneladas) (INASE, 2019).

El incremento en la producción de semillas podría deberse a la acción de las abejas melíferas en la medida que deben recurrir al trébol rojo ante la creciente falta de ofertas florales en los últimos años (Carlos Rossi, comunicación personal). Esta nueva situación ha permitido incluso exportar semillas, brindándole a Uruguay la posibilidad de posicionarse en un nuevo rol de exportador de semillas de trébol rojo. Para aumentar la producción de semillas de trébol rojo en Uruguay es necesario generar tecnologías

adecuadas. Dentro de esas tecnologías le cabe un rol protagónico a la polinización entomófila ya que frecuentemente es el factor responsable de limitar la producción de semillas en este cultivo (Rao *et al.*, 2007; Taylor y Quesenberry, 1996; Free, 1993; Holm, 1966).

El trébol rojo es auto-estéril, el polen no puede fertilizar los óvulos de la misma planta, por lo que requiere de polinización cruzada (Carámbula, 1981). La inflorescencia está formada por 55 a 275 flores, cuya corola es un tubo largo y angosto de 7,5-12,4 mm de largo y 1,6-2,5 mm de ancho (Varela y Rebuffo, 1999; Carámbula, 1981); el néctar es secretado en la base y se extiende sólo de 1,35 a 1,47 mm hacia arriba en el tubo (Free, 1970). Estas características determinan que el trébol rojo sea la leguminosa forrajera de corola más profunda y con mayores dificultades para lograr una polinización efectiva (Varela y Rebuffo, 1999). Las flores se abren durante un período de 6-8 días desde la base de la inflorescencia hacia arriba y, según Umaerus y Akerberg (1959), deben ser fecundadas entre el segundo y cuarto día de abiertas, por lo que es necesaria una alta densidad de polinizadores en el cultivo para que las flores puedan ser fertilizadas tan rápido como aparecen (Palacio, 1987). Los estambres y el pistilo se extienden hasta el ápice de la corola pero están encerrados en los pétalos de la quilla. Cuando una abeja presiona con su cabeza la quilla, las anteras y el estigma quedan en contacto con la abeja usualmente en la parte posterior ventral de la cabeza, donde queda cargada con granos de polen (Plowright y Hartling, 1981; Woodrow, 1952).

Los abejorros fueron considerados de tal importancia como polinizadores que una especie, *B. ruderatus*, fue introducida en Nueva Zelanda (donde no existen especies nativas) entre 1885 y 1906, y en Chile en 1986, con el único fin de polinizar el trébol rojo (Heinrich, 2004), lo que significó un incremento sustancial en el rendimiento de semillas de esta especie (Holm, 1966).

En Uruguay, de acuerdo a los estudios disponibles, han predominado los intentos de mejorar la producción de semillas de trébol rojo basados en la

utilización utilizando abejas melíferas como polinizadores, pero los resultados obtenidos no han sido relevantes, aún empleando una alta concentración de colmenas por hectárea, no se ha consiguiendo superar los 120 kg/ha (Formoso, 2010; García *et al.*, 1991). Esto demuestra que las abejas melíferas no polinizan satisfactoriamente éste cultivo, lo que abre la posibilidad de implementar la utilización de abejorros para incrementar los rendimientos de semilla del trébol rojo.

Los abejorros han sido ampliamente reconocidos como excelentes polinizadores del trébol rojo (Heinrich, 2004; Goulson, 2003; Kearns y Thomson, 2001; Varela y Rebuffo, 1999; Brodie, 1996; Plowright y Laverty, 1984; Michener, 1974; Free 1970; Holm, 1966; Bohart, 1957), siendo más eficientes que la abeja melífera. Muchas especies de *Bombus* poseen probóscides largas y por tanto pueden alcanzar el néctar del trébol rojo con facilidad (Michener 2007; Heinrich, 2004; Goulson, 2003; Brodie, 1996) por lo que esta leguminosa representa una fuente importante de alimento. El largo de la probóscide en relación a la longitud de la corola de la flor está asociado con la velocidad y modo de trabajo de una abeja, lo que a su vez determina la eficiencia con la que ésta poliniza una especie vegetal (Holm, 1966). Por lo tanto, los abejorros son capaces de visitar más flores por unidad de tiempo que las abejas melíferas (Heinrich, 2004; Kearns y Thomson, 2001; Plowright y Hartling, 1981; Free, 1965; Peterson *et al.*, 1960) y en consecuencia cada uno poliniza un mayor número de flores. Tanto *B. atratus*, como *B. bellicosus*, pertenecen a las especies consideradas de “lengua larga” midiendo  $8,4 \pm 0,65$  mm y  $7,9 \pm 0,79$  mm, respectivamente (Arbulo *et al.*, 2011). En este sentido, Salvarrey (2012) encontró que las dos especies de abejorros presentan una mayor velocidad de pecoreo, superando ampliamente a *A. mellifera*. En dicho estudio, se constató que las tres especies de ápidos visitaron igual número (5) de inflorescencias en un minuto, pero mientras las abejas melíferas visitaron 8 flores, *B. atratus* y *B. bellicosus* visitaron 24 y 21 flores, respectivamente. Adicionalmente, ambas especies presentan una alta preferencia por el trébol

rojo (Salvarrey *et al.*, 2017; Arbulo *et al.*, 2011), lo que ubica a los abejorros nativos como una potencial herramienta biotecnológica para mejorar los rendimientos de semilla.

Los primeros estudios a nivel nacional fueron reportados por Varela y Rebuffo (1999) quienes realizaron un conjunto de experiencias de polinización de trébol rojo con *B. bellicosus* obteniendo resultados auspiciosos. Utilizando pequeños invernáculos encontraron que los abejorros son mejores polinizadores que las abejas melíferas y en una experiencia a campo obtuvieron un rendimiento promedio de semillas significativamente superior al promedio nacional (370 kg/ha). En otro estudio verificaron que la producción de semilla por hectárea disminuyó al aumentar la distancia a las colonias de abejorros (Varela y Rebuffo, 1999).

Posteriormente, Salvarrey *et al.* (2017) realizaron un estudio en el que se utilizaron abejorros nativos *B. atratus* y *B. bellicosus* como principales polinizadores de un semillero de trébol rojo en su segunda floración. Encontró que los abejorros se distribuyeron de acuerdo al número de inflorescencias disponibles en el semillero y obtuvo un promedio de cuajado de  $68,9 \pm 10$  %, superior al máximo valor de cuajado del trébol rojo reportado para el país (61,9 %) (Formoso, 2010), y una producción de semillas de 74 kg/ha. Con estos valores se pudo extrapolar que la producción de semillas en una primera floración (700 inflorescencias/m<sup>2</sup>) podría llegar a 836 kg/ha, siendo este un rendimiento que se aproxima mucho al potencial biológico del cultivo (Salvarrey *et al.*, 2017).

Los buenos antecedentes nacionales de producción de semillas de trébol rojo utilizando abejorros sumado a la reciente disponibilidad de colonias de *B. atratus* obtenidas mediante cría artificial de forma desestacionalizada, genera la posibilidad de dar un salto tecnológico que permita superar el déficit de semillas de esta importante leguminosa forrajera.

### 1.5.2. Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más importantes del mundo. Su fruto es fuente esencial de nutrientes para la dieta del ser humano ya que contiene una variedad de vitaminas, minerales, carotenos y flavonoides. Se produce principalmente para el consumo en fresco, pero también es utilizado como materia prima para la elaboración de diversos derivados. Aunque su origen americano, en la actualidad se cultiva en más de cien países alcanzando ser a nivel mundial el octavo producto agroalimentario en relación a los ingresos generados y el onceavo en relación a las toneladas producidas (FAOSTAT, 2016)

En Uruguay, según datos de Dirección Información Estadística Agropecuaria (DIEA-MGAP), entre el 2014-2015 el tomate fue el principal cultivo hortícola tanto en volumen fresco como en valor económico. La superficie cultivada en ese período de tiempo fue de 382 hectáreas, de las cuales el 95 por ciento se destinó al consumo en fresco y el resto a la industria (DIEA, 2019). El mercado interno se encuentra abastecido por una producción anual continua. Para esto, se utiliza zonas de cultivos con distinta aptitud agro-ecológica y aplicando diversas tecnologías. En la zona norte (Salto y Bella Unión) la mayoría de la producción es bajo invernáculo. En la zona sur (principalmente Canelones) predomina la producción de tomate a campo durante el verano pero también se produce bajo invernáculos para cosecha temprana en primavera (ciclo verano-otoño) y tardía en otoño (ciclo primavera verano (Aldabe, 2000).

Entre los factores que disminuyen el rendimiento del tomate se destacan la falta de polinización, las temperaturas desfavorables para la antesis, la iluminación insuficiente y el exceso o falta de nutrientes y humedad relativa que cuando es alta dificulta la liberación de granos de polen y cuando es baja, obstaculiza la germinación del tubo polínico (Aldana *et al.*, 2007).

La flor del tomate es hermafrodita, presenta autopolinización, es hipoginia (se dirige hacia abajo) y se dispone en forma de inflorescencias de tipo racimo. El primer racimo floral aparece entre la 5ª y 7ª hoja, variando

según el cultivar y las condiciones ambientales. Los siguientes racimos, aparecen de forma regular cada tres hojas. En condiciones normales, la planta llega a tener hasta 10 racimos, de los cuales los últimos son los que presentan mayor dificultad en ser polinizados de forma espontánea. Debido a esto, en cultivos comerciales, se fuerza la maduración cortando el meristemo apical evitando el crecimiento de más racimos. Las primeras flores del racimo (las más cercanas al tallo) pueden estar totalmente abiertas mientras que las últimas todavía ni parece que se vayan a abrir. La morfología floral consta de 5 o más sépalos con igual número de pétalos e igual número de estambre. Los estambres están muy desarrollados y están soldados formando un cono estaminal que envuelve el gineceo. Las anteras poseen dehiscencia poricida, lo que implica una ruptura en ápice de las mismas formándose poros por donde se libera el polen, esto es característico de la familia de las solanáceas (Argerich y Gaviola, 1995). La liberación de polen por parte de las flores se logra por vibraciones a una frecuencia de aproximadamente 400 Hz (King, 1993). El movimiento de la flor, que puede incluso estar dado por el viento, es suficiente para que los estambres esparzan su polen sobre los estigmas y, al ser una planta autógena, su polinización se da fácilmente (Salinas Navarrete, 2010). Aun así, se ha comprobado que el tamaño del fruto depende directamente de la cantidad de granos de polen que se depositan sobre el estigma; así, a menor cantidad, se producen frutos más pequeños, con pocas semillas y deformes (Free, 1970). En condiciones de invernáculo, en ausencia o baja densidad de insectos apropiados para su polinización y donde tampoco hay viento es necesario recurrir a métodos que garanticen la liberación de grandes volúmenes de polen o que modifiquen las condiciones fisiológicas de la flor y así lograr una mayor calidad de fruto. Con esta finalidad se han utilizado la polinización manual, polinizadores eléctricos manuales (Morandin *et al.*, 2001a) y reguladores de crecimiento para estimular la partenocarpia (formación de frutos sin semillas viables); no obstante, su uso incrementa la labor y los costos de producción (Velthuis, 2002; Kaftanoglu, 2000).

Naturalmente, las vibraciones necesarias para la liberación del polen del tomate sólo las producen algunas abejas solitarias y los abejorros del género *Bombus* (Vergara *et al.*, 2006).

Los abejorros son especialmente reconocidos como polinizadores de las solanáceas, particularmente del tomate, porque son capaces de realizar “polinización por zumbido” sacudiendo las flores al prenderse de las anteras y contraer los músculos de vuelo sin volar (Velthuis y van Doorn, 2006, Heinrich, 2004; Estay *et al.*, 2001; Van den Eijnde *et al.*, 1991). Los beneficios del uso de abejorros como polinizadores del tomate radican, por un lado, en la disminución de costos al reemplazar mecanismos de polinización más costosos (manual, vibradores eléctricos, hormonas) y por otro, en las mejoras obtenidas en la calidad de los frutos y en la producción total (Vethuis y van Doorn, 2006). Varias investigaciones han constatado un aumento en el cuajado de frutos al utilizar abejorros como polinizadores en comparación con situaciones de ausencia de los mismos (Velthuis y van Doorn, 2006; Morandin *et al.* 2001b; van Ravestijn y van der Sande, 1991). Además, los frutos producto de la polinización con abejorros poseen mayor número de semillas, diámetro y peso, que los producidos en ausencia de abejorros (Aldana *et al.*, 2007; Estay *et al.*, 2001; Morandin *et al.*, 2001b; Dogterom *et al.*, 1998; van Ravestijn y van der Sande, 1991) e incluso que aquellos frutos obtenidos por polinización manual (Dogterom *et al.*, 1998). Asimismo, la cantidad de semillas, al influir sobre la fisiología del fruto, afecta la jugosidad y la concentración de azúcar del mismo (Velthuis, 2002). Aldana *et al.* (2007) encontraron, además, que los frutos polinizados por abejorros presentan formas más regulares y redondeadas como resultado del desarrollo uniforme de más lóculos.

Adicionalmente, las colonias de abejorros se adaptan perfectamente a las condiciones de invernáculo (van Doorn *et al.*, 2006; Morandin *et al.* 2001b; van den Eijnde *et al.*, 1991). En este sentido diversas investigaciones han resaltado las características que hacen esto posible. Los materiales con los que se construyen los invernáculos son altamente variables y éstos

condicionan la iluminación dentro de los mismos, pudiendo excluir o no la radiación ultravioleta. Las abejas poseen una visión muy sensible y la radiación ultravioleta puede afectar la forma en que perciben las flores y por ende, afectar la elección de los recursos (Dyer y Chittka, 2004). Sin embargo, al estudiar el efecto que tiene sobre los abejorros trabajar en ausencia de radiación ultravioleta, se comprobó que su actividad no se ve afectada. Si bien los abejorros perciben los cambios producidos en la iluminación igualmente, son capaces de aprender a reconocer las flores, encontrándolas sin ningún problema (Dyer y Chittka, 2004). Por otro lado, en el género *Bombus* se ha descrito un sistema de comunicación más primitivo que el presente en otras abejas eusociales (como las abejas melíferas y las abejas sin aguijón) (Dornhaus y Chittka, 2005; Goulson 2003; Kearns y Thomson, 2001). Los abejorros basan su distribución predominantemente en experiencias individuales. Esto es una ventaja porque las pecoreadoras podrían visitar otros recursos sin que esto signifique un movimiento importante de individuos hacia fuera del invernáculo (Wolf y Moritz, 2008). Al estudiar el rango de forrajeo de pecoreadoras se determinó que vuelan a una distancia media de 267,2 m, llegando a una distancia máxima de 800 m. La distribución de las mismas en el invernáculo respondió exclusivamente a la disponibilidad de recursos por lo que, irían visitando los recursos disponibles hasta polinizar homogéneamente una gran superficie dentro de un invernáculo con medidas comúnmente usadas (1000 m<sup>2</sup>) (Wolf y Moritz, 2008).

Esta tesis se enfocará en primer lugar en estudiar los beneficios de la polinización del trébol rojo y el tomate en cultivos protegidos con colonias de *B. atratus*, y en segundo lugar en identificar exhaustivamente los parásitos y patógenos que pueden afectar las poblaciones naturales y la cría artificial de ésta especie.

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Esta tesis estará guiada por tres grandes hipótesis de trabajo:

- El empleo de colonias de abejorros *Bombus atratus* como polinizadores del trébol rojo (*Trifolium pratense*) permitirá superar los problemas de polinización de esta leguminosa mejorando la producción de semillas.

- Los abejorros *B. atratus* no ven afectado su comportamiento cuando se los coloca dentro de invernáculos con tomates (*Solanum lycopersicum*) y contribuyen a aumentar el rendimiento del cultivo mediante una mejora en el porcentaje de cuajado de las plantas y el incremento del tamaño, peso y cantidad de semillas de los frutos.

- En los abejorros *B. atratus* de Uruguay se encuentran presentes una amplia comunidad de parásitos internos, ácaros y virus ARN pero afectan de manera diferente a las reinas, los abejorros de colonias silvestres y los abejorros obtenidos mediante cría artificial.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el rendimiento de semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en un semillero polinizado por abejorros *Bombus atratus*.

- Determinar el rendimiento de tomates (*Solanum lycopersicum*) cultivados en invernáculos polinizados por abejorros *Bombus atratus*.

- Identificar los diferentes parásitos, patógenos y virus ARN presentes en reinas, abejorros de colonias silvestres y abejorros obtenidos mediante cría artificial.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.1. Analizar la evolución de la población de las colonias de abejorros y su ritmo de actividad durante el periodo de floración del trébol rojo.

1.2. Determinar el origen botánico de los recursos poliníferos y nectaríferos explotados por los abejorros.

1.3. Cuantificar la distribución de los abejorros a diferentes distancias de los nidos.

1.4. Identificar y cuantificar las especies de insectos que visitan las inflorescencias de trébol rojo.

1.5. Determinar diferentes indicadores de rendimiento de semillas de trébol rojo y correlacionarlos con la presencia de abejorros.

1.6. Comparar la eficacia como polinizadores de los abejorros y las abejas melíferas.

2.1. Analizar la evolución de la población de las colonias de abejorros y su ritmo de actividad en el invernáculo durante el periodo que se encuentren polinizando el tomate.

2.2. Estimar el efecto de la polinización con abejorros en el rendimiento y calidad de los tomates.

2.3. Cuantificar el efecto de la polinización con abejorros en las propiedades físico-químicas de los tomates.

3.1. Identificar las especies de parásitos internos, ácaros y virus ARN presentes en los abejorros.

3.2. Determinar las diferencias en prevalencia e intensidad de infección de los principales parásitos y virus entre reinas, obreras de colonias silvestres y obreras de colonias obtenidas mediante cría artificial.

3.3. Analizar la diversidad de ácaros en reinas, obreras de colonias silvestres y obreras de colonias obtenidas mediante cría artificial.

## 4. CAPITULO 1. POLINIZACIÓN EN TRÉBOL ROJO (*TRIFOLIUM PRATENSE*) CON ABEJORROS *BOMBUS* *ATRATUS*

### 4.1. INTRODUCCIÓN

El trébol rojo (*Trifolium pratense*) es una de las leguminosas forrajeras más utilizadas en Uruguay (Formoso, 2010; Izaguirre y Beyhaut, 1997). La producción de semillas de esta especie ha sido históricamente problemática, con rendimientos que están lejos del potencial de cosecha y de los valores obtenidos en otros países. Este bajo rendimiento se explica en buena parte por las dificultades de polinización (Rao y Stephen, 2009; Rao *et al.*, 2007; Taylor y Quesenberry, 1996). Con el empleo de abejas melíferas como polinizadores no se han conseguido avances sustanciales, debido a que estos insectos tienen una lengua que no les permite acceder fácilmente al néctar que se halla debajo de una corola profunda, por lo que suelen optar por otros recursos (Heinrich, 2004; Kearns y Thomson, 2001).

Los abejorros del género *Bombus* han sido reconocidos como buenos polinizadores del trébol rojo, especialmente por contar con probóscides largas que les permite acceder sin dificultad al néctar (Dharam, 2012; Heinrich, 2004; Goulson, 2003; Holm, 1966). El dominio de la técnica de cría artificial de colonias de abejorros desde la década de 1980 permite trasladar colmenas para polinizar cultivos, de la misma manera que se hace con las abejas melíferas (Velthuis y van Doorn, 2006).

En Uruguay hay algunos estudios que muestran que los abejorros nativos, *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* podrían mejorar sustancialmente la producción de semillas de trébol rojo (Salvarrey *et al.*, 2017; Varela y Rebuffo, 1999). En particular, en el estudio de Salvarrey *et al.* (2017) realizado en un semillero de trébol rojo en su segunda floración empleando en su mayoría abejorros de nidos naturales, se encontró un porcentaje de cuajado de 68,9 %, de los más altos registrados en el país (Formoso, 2010). Este trabajo generaba muchas expectativas sobre el

rendimiento de semillas que podría obtenerse en un semillero en su primera floración (diciembre-enero) de contar con colonias de abejorros (en ese periodo las colonias son muy pequeñas y casi no se observan abejorros en el campo). Esta limitante podría ser superada con colonias de abejorros obtenidas mediante cría artificial de forma desestacionalizada. En Argentina, la empresa Brometán comercializa colonias de abejorros *B. atratus* prácticamente todo el año (Gennari, 2012).

Este estudio está dirigido a determinar la eficacia de los abejorros obtenidos mediante cría artificial como polinizadores del trébol rojo.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Aspectos generales

Las actividades de campo se realizaron durante los meses de diciembre de 2018 y enero de 2019 en La Estación Experimental “La Estanzuela” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), ubicada en el departamento de Colonia (34° 20' S, 57° 41' W). Se utilizó un semillero 5 hectáreas de trébol rojo del cultivar Estanzuela 116, el cual fue manejado para que su floración coincidiera con el arribo de los abejorros. Los trabajos con las colonias de abejorros, la observación de los polinizadores en el semillero y el registro de la evolución de la floración del trébol rojo se desarrollaron los días 26 y 30 de diciembre y 3, 8, 16, 23 y 30 de enero. Una vez terminados se dio tiempo al secado y la maduración de semillas y el 14 de febrero se realizó el corte del semillero.

Las tareas de laboratorio para determinar el rendimiento de semillas de trébol rojo y el análisis palinológico de las muestras de néctar y polen se llevaron a cabo durante los meses de febrero a julio de 2019 en el Laboratorio de Semillas de INIA y en la Sección Etología de la Facultad de Ciencias, respectivamente.

### 4.2.2. Instalación y evaluación de los nidos de abejorros

El 18 de diciembre de 2018 arribaron al aeropuerto de Carrasco desde Argentina, 18 colonias de abejorros *B. atratus* aportadas por la empresa Brometan para la realización de este estudio (Figura 3). Ese mismo día fueron trasladadas a la estación experimental INIA La Estanzuela y conservadas durante dos días en una pieza a menos de 20 °C. Las colonias estaban colocadas dentro de caja plástica de 28 x 25 x 13 cm, especialmente diseñadas para que la utilización de las colmenas sea lo más práctica posible. Las cajas cuentan con zonas de aireación, espacio para la cría y un dispensador interno de jarabe de azúcar.



Figura 3. Arribo de las colonias de abejorros de *B. atratus* al aeropuerto de Carrasco.

El día 20 de diciembre 16 colonias (dos colonias estaban muy despobladas y se descartaron) se colocaron en cajas de telgopor para amortiguar el efecto del calor y se llevaron al semillero. Fueron instaladas en grupos de cuatro en cuatro refugios contruidos con arcos de metal y malla sombra aluminizada con trama de 80 % situados en un lado del semillero. A cuatro colonias de un grupo se le quitó la reserva de jarabe (Figura 4).



Figura 4. Vista del semillero y los refugios con las colmenas de abejorros.

#### 4.2.3. Demarcación de las parcelas de observación en el semillero

Al comenzar la floración y antes de la instalación de los abejorros se delimitaron 4 parcelas de 2 x 5 m en tres distancias desde la ubicación de los nidos (10, 80 y 160 m), resultando en un total de 12 parcelas. El día 21 de diciembre, antes de que los abejorros comenzaran a trabajar sobre el cultivo, se eliminaron todas las inflorescencias maduras (de coloración marrón posiblemente ya polinizadas) dejando las inflorescencias de color rosado fuerte que son las atractivas para los insectos polinizadores, así como aquellas en las que las flores no habían abierto aún. Las inflorescencias que poseían al menos algunas flores rosado fuerte fueron contadas en cada día de registro de la actividad de los abejorros en la pradera.

#### 4.2.4. Instalación de carpas experimentales

Al comienzo de la floración se colocaron en uno de los lados del semillero 6 carpas de 3 x 6 m cubiertas con una tela tejida de 1 mm de perforación. En dos carpas se colocó un núcleo de abejas melíferas de 8000 obreras aproximadamente, en otras dos se colocó un nido de abejorros *B. atratus* con aproximadamente 60 obreras y las restantes dos carpas permanecieron sin polinizadores. Antes de colocar los nidos dentro de las

carpas, se extrajeron todas las inflorescencias maduras que ya habían sido polinizadas (Figura 5).



Figura 5. Instalación de carpas de experimentación en el semillero de trébol rojo.

#### 4.2.5. Evaluación del tamaño de las colonias de abejorros

Durante la noche se abrían las colmenas con cuidado y se sacaba una fotografía, además de verificar la presencia de la reina. A partir de la imagen obtenida se determinó el número de abejorros, de pupas, de puestas nuevas de huevos y de bolsillos almacenadores de polen (Figura 6).



Figura 6. Apertura de las colmenas de abejorros para fotografiarlos.

#### 4.2.6. Ritmo de actividad de los abejorros

La actividad de los abejorros en los nidos y sobre la pradera se evaluó en la mañana (10-12hs) y en la tarde (15-17 hs) durante el período de floración del trébol rojo. Para ello, durante 15 minutos se registró el número de individuos que salían y entraban en los 4 nidos de cada refugio, indicando si los individuos que entraban tenían carga de polen o no.

#### 4.2.7. Colecta de polen corbicular y néctar

El polen corbicular de los abejorros que retornaban a las colmenas se colectó de mañana y de tarde. Para ello, luego de cada registro del ritmo de actividad se tapaban los orificios de entrada de los nidos de cada refugio y se capturaban 10 individuos que retornaban con polen, se les extraía la carga y se los liberaba. De este modo, se colectaron 40 muestras de polen de mañana y 40 en la tarde. Las muestras se guardaron en freezer hasta su posterior análisis palinológico (Figura 7).



Figura 7. Captura de abejorros que regresaban a la colmena luego de su viaje de pecoreo y extracción del polen corbicular.

La colecta de néctar se obtuvo de noche cuando se abrieron las colmenas para fotografiarlas, empleando una jeringa para extraer el néctar de los pots. Se tomaron muestras colectivas de las 4 colmenas de cada

refugio (Figura 8). Las muestras se guardaron en freezer hasta su posterior análisis palinológico.



Figura 8. Extracción del néctar contenido en los pots de los nidos de abejorros.

#### 4.2.8. Determinación del origen botánico de las muestras de polen y néctar

##### 4.2.8.1. Preparación de las muestras de polen y néctar

El polen extraído de las corbículas de los abejorros no necesita preparación, se tomó la muestra y se la montó sobre un portaobjeto y se la observó bajo el microscopio. Para realizar el análisis palinológico de las muestras de néctar extraído de los pots de los nidos de abejorros, el primer paso fue purificar las mismas. Debido a la forma de extracción, por medio de jeringas, las muestras contenían restos de cera y mucho volumen de agua que deben descartar. Para eso se colocó en un tubo falcon 10 ml de néctar y 15 ml de agua caliente (para disolver la cera presente). La solución obtenida se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se repitió la operación hasta la eliminación total de los restos de cera. Finalmente se obtuvo un *pellet* limpio de polen.

#### 4.2.8.2. Identificación del origen botánico de las muestras

El origen botánico de los granos de polen de las muestras de polen corbicular y del néctar se determinó utilizando técnicas palinológicas convencionales y guías de referencia (Louveaux *et al.*, 1978). Una vez que los preparados estaban en el portaobjetos se observaron al microscopio (400x) *ad libitum* y se estableció el siguiente criterio para la cuantificación: si se observaban solamente granos de polen de un tipo floral se contaban 200 granos de polen, si aparecían más de un tipo floral se contaban 400 granos de polen y si se encontraban muchos tipos florales, se contabilizaron 600 granos de polen (Figura 9).



Figura 9. Análisis palinológicos de las muestras de polen y néctar. El polen fue extraído de las corbículas de los abejorros cuando regresaban de forrajear y el néctar fue obtenido de los pots de almacenamiento de los nidos.

#### 4.2.9. Presencia de los abejorros y otros polinizadores en el semillero

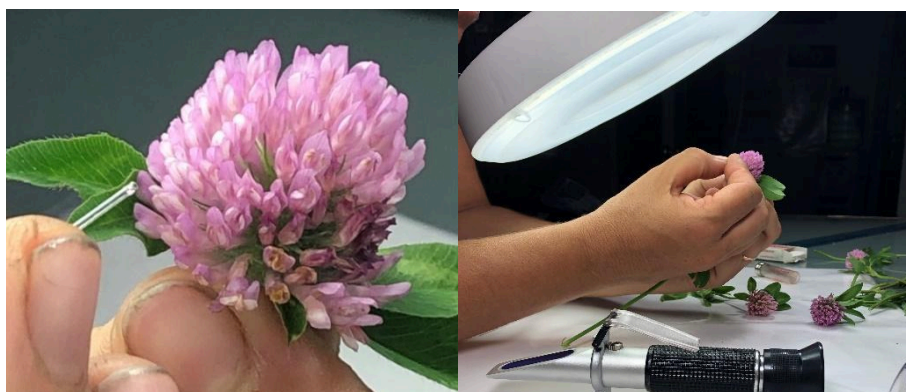
En cada parcela se registró durante cinco minutos el número de abejorros que estaban pecoreando en las inflorescencias de trébol rojo indicando si poseían carga de polen o no. También se registró la presencia

de otros insectos polinizadores determinando el grupo taxonómico al que pertenecen y la especie en los casos que fue posible.

#### 4.2.10. Cuantificación del volumen de néctar en flores de trébol rojo

Los días 8, 16 y 23 de enero en la mañana y en la tarde se cortaron 10 inflorescencias de trébol rojo elegidas al azar y en cada una de ellas se midió el volumen de néctar de 6 flores elegidas al azar. La medición se realizó introduciendo un microcapilar en la flor para que el néctar suba por capilaridad. De acuerdo a la capacidad del capilar y la distancia ocupada por el néctar se calculó el volumen del mismo que contenía cada flor (Figura 10).

Figura 10. Determinación del volumen de néctar contenido en las flores



mediante microcapilar.

#### 4.2.11. Rendimiento de semillas

El día 30 de enero se observó que la gran mayoría de las inflorescencias estaban maduras por lo que se dio por terminado el período de polinización del semillero. Se dejó secar el semillero por 14 días y se realizó la trilla. Para determinar el efecto de los polinizadores en la producción de semillas se evaluaron diferentes indicadores de rendimiento en submuestras tomadas en cada parcela y en las carpas (Figura 11a). Para la obtención de las submuestras del cultivo se utilizaron dos cuadrantes de 56 x 76 cm en parcelas y de tres en las carpas, esa superficie fue cortada al ras y guardada en bolsas de papel, a partir de ellas se determinarán indicadores más específicos de rendimientos siguiendo el mismo proceso de

cosecha que el resto de la superficie. Las diferentes muestras obtenidas fueron pesada y puesta a secar en estufa a 34°C (Figura 11a). En el Laboratorio de Semillas de INIA se realizó la trilla en desaristadora (dos veces) con procesos de ventilación (Lasti-Damas), luego se aislaron las semillas frotando la muestra en una superficie ranurada de madera empleando un cepillo con superficie de goma (fretacho) intercalado con ventilación. Los indicadores de rendimiento obtenidos fueron los siguientes: cabezuelas totales/m<sup>2</sup>, cabezuelas maduras/m<sup>2</sup>, peso limpio, número de semillas por cabezuela, peso de 1000 semillas y peso total (kg/ha). Adicionalmente se seleccionaron semillas de cada parcela y se determinó el porcentaje de germinación (Figura 11b).

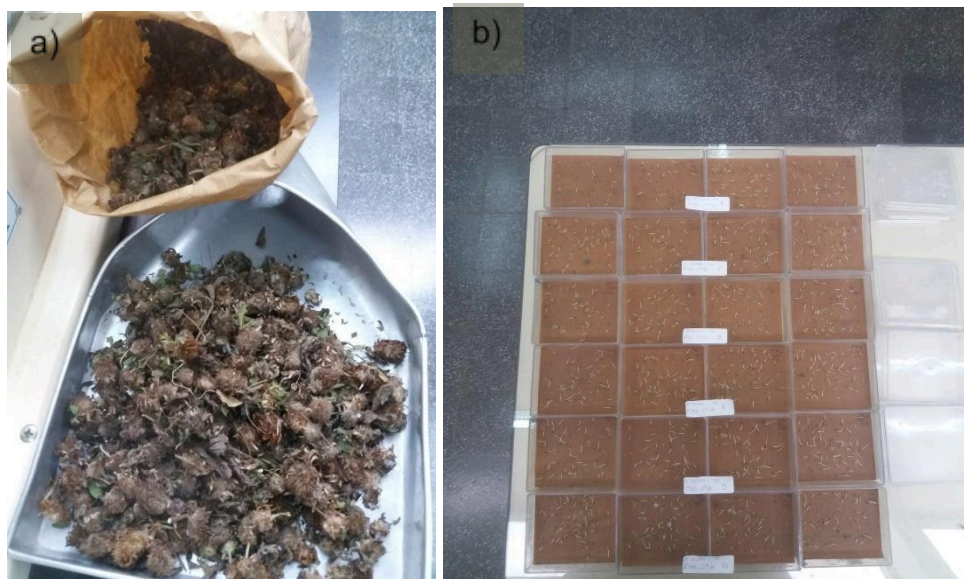


Figura 11. Determinación de la producción de semillas de trébol rojo. Secado de inflorescencias en bolsas de papel (a) y cuantificación de germinación de semillas (b).

#### 4.2.12. Análisis Estadísticos

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SAS (SAS®, 2002). Se comenzó con un cálculo de correlaciones, utilizando el PROC CORR. Luego se probaron diferentes modelos utilizando como

base el PROC GLM (Modelo Lineal General). En etapas posteriores se utilizó el PROC MIXED cuando el análisis consideró algunos efectos como aleatorios, o el PROC GENMOD cuando las variables no cumplían los supuestos del análisis GLM, generalmente debido a que los datos son de conteo. El criterio para determinar si un efecto fue significativo fue la prueba F, se reportó el valor de p y se consideró significativo los efectos con p menor a 0,05 (Littell *et al.*, 2007).

#### 4.3. RESULTADOS

##### 4.3.1. Evolución de las colonias de abejorros

El análisis de las fotografías tomadas en cada colmena a lo largo del período de estudio permitió determinar con exactitud el número de obreras y las condiciones de la cría (Figura 12).



Figura 12. Fotografías del nido de una colonia de abejorros que muestra la evolución de la población durante el período de estudio.

Las colonias al instalarse presentaban en torno a 90 obreras cada una sumando un total de 1492 obreras en los 16 nidos, pero el número decae bastante durante los primeros días de enero para luego comenzar a subir hasta alcanzar valores de población cercanos al inicial (Figura 13).

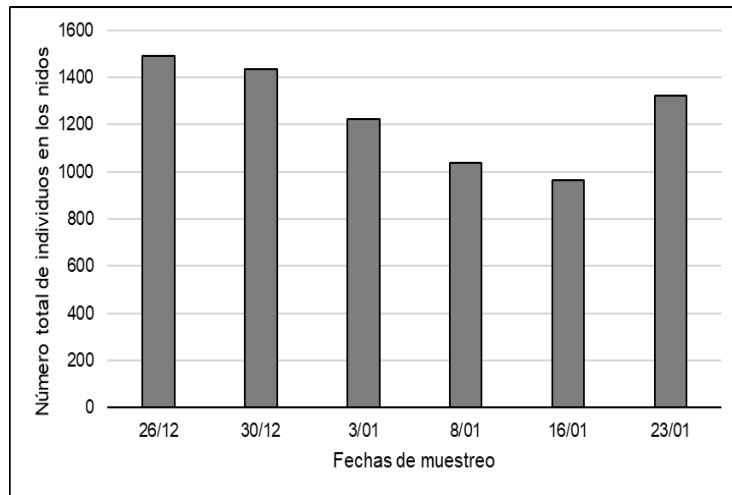


Figura 13. Población total de abejorros a lo largo del período de floración del trébol rojo.

Cabe señalar que la deriva de abejorros entre nidos fue muy importante dentro de cada refugio, siendo la cuarta colonia hacia el sur la que captaba la mayoría de los abejorros. A pesar del movimiento individual de los abejorros entre diferentes nidos, el número medio de cada nido no fue menor a 60 individuos durante el período de estudio (Figura 14).

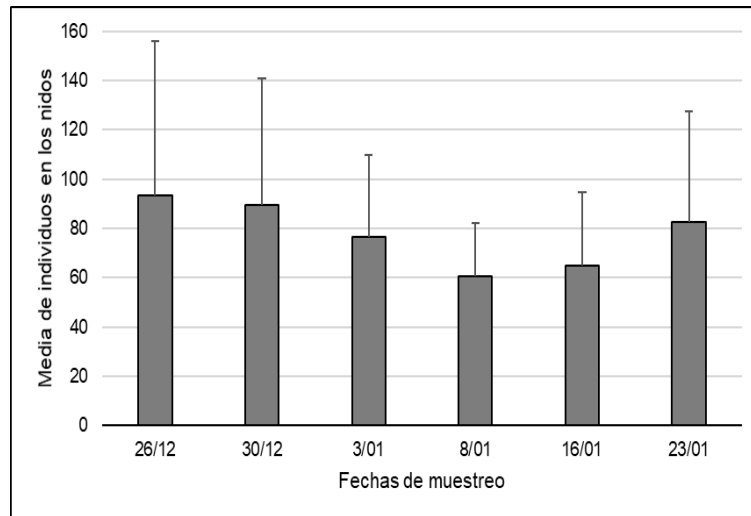


Figura 14. Número medio y desvío estandar de abejorros en las colonias a lo largo del período de floración del trébol rojo.

#### 4.3.2. Ritmo de actividad de los abejorros

El registro de entradas de abejorros a los nidos a lo largo del período de floración del semillero fue variable. En la mayoría de los registros se evidencia una mayor actividad en la mañana que en la tarde, tanto en el número de entradas ( $F= 14,29$ ;  $P= 0,0005$ ) como en el número de salidas ( $F= 2,82$ ;  $P= 0,0055$ ) tendencia que se acrecienta hacia la segunda mitad del período de floración (Figura 15).

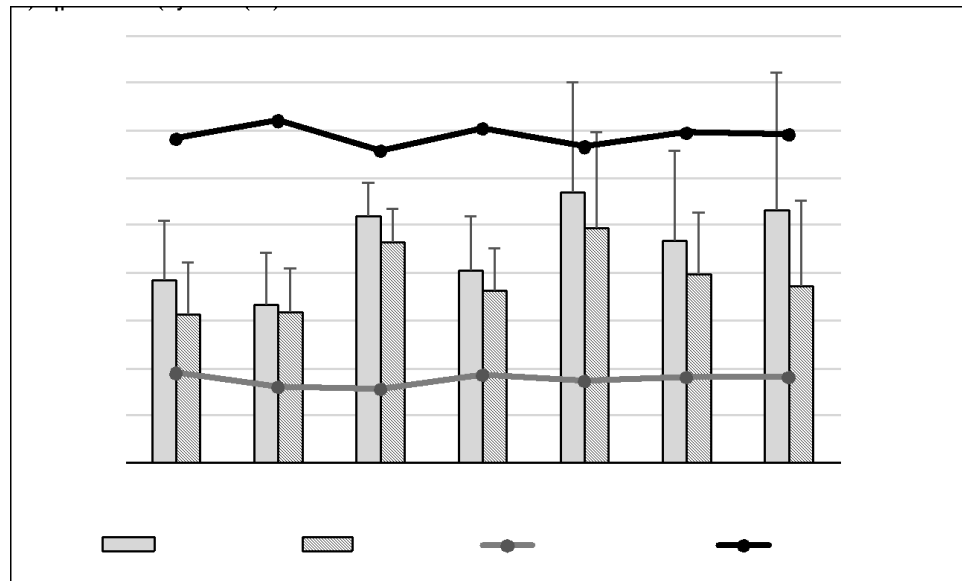


Figura 15. Media de abejorros que entran y salían de los nidos en relación a la temperatura media (°C) y humedad relativa media (%) registrada en cada día de muestreo. La media se calculó a partir de los registros de cada refugio en las diferentes fechas de muestreo.

No se encontró relación entre el número de abejorros que entran y salían y la temperatura media (°C) ( $F= 0,41$ ;  $P= 0,53$ ) y lo mismo ocurrió con la humedad relativa diaria (%) ( $F= 0,23$ ;  $P= 0,63$ ). El número medio de abejorros que entran cargando polen en sus corbículas fue mayor en la mañana ( $F= 72,23$ ;  $P= 0,0001$ ).

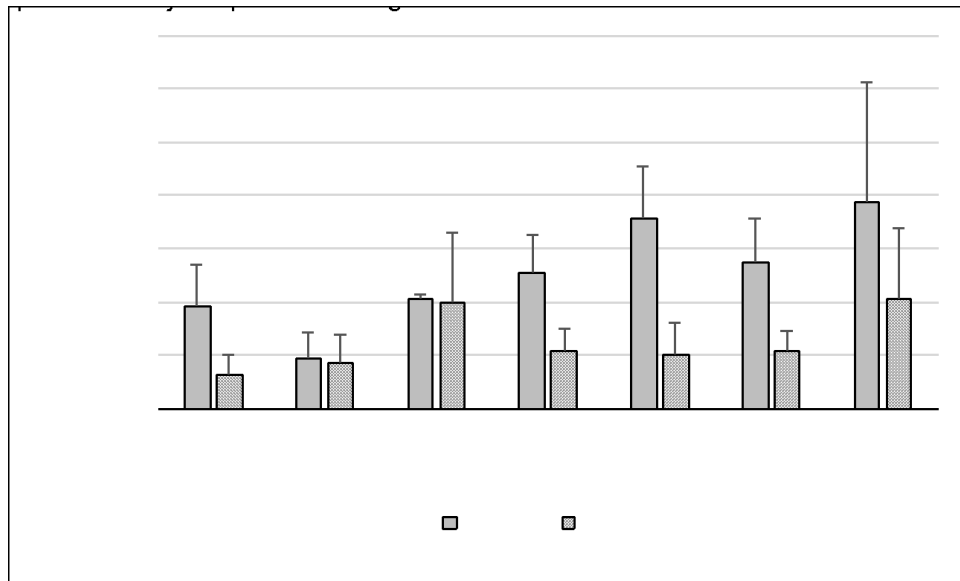


Figura 16. Medias y desvío estándar de abejorros que regresaban al nido con carga de polen en sus corbículas luego de un viaje de forrajeo. La media se calculó a partir de los registros de cada refugio en las diferentes fechas de muestreo.

#### 4.3.3. Evolución de la floración de trébol rojo

El número promedio de inflorescencias de trébol rojo atractivas para los insectos se incrementó en forma sostenida desde el 21 de diciembre (7,1 inflorescencias/m<sup>2</sup>) hasta el 16 de enero de 2019 (110,9 inflorescencias/m<sup>2</sup>). Luego comenzó un marcado descenso en el número de inflorescencias receptivas hasta el final de la floración (Figura 17).

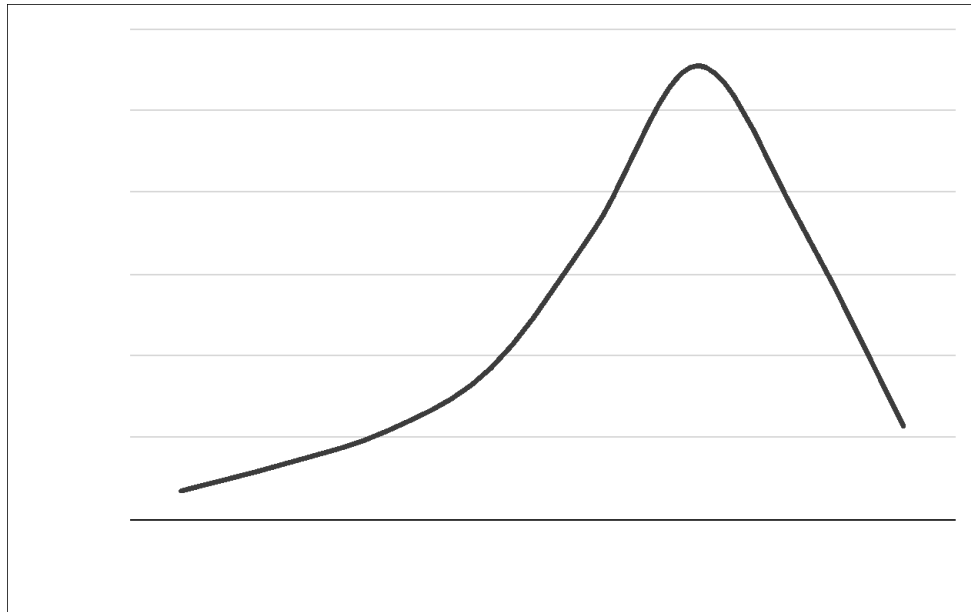


Figura 17. Evolución de la floración de trébol rojo medido a partir del número medio de inflorescencias receptivas presentes en las parcelas de observación en cada muestreo.

#### 4.3.4. Volumen de néctar en las flores de trébol rojo

El 68 % de las flores de trébol tenían néctar en sus corolas, en ellas, el volumen no presentó variaciones a lo largo del período de floración ( $F= 0,13$ ;  $P= 0,87$ ) ni a lo largo del día ( $F= 0,69$ ;  $P= 0,41$ ) (Figura 18).

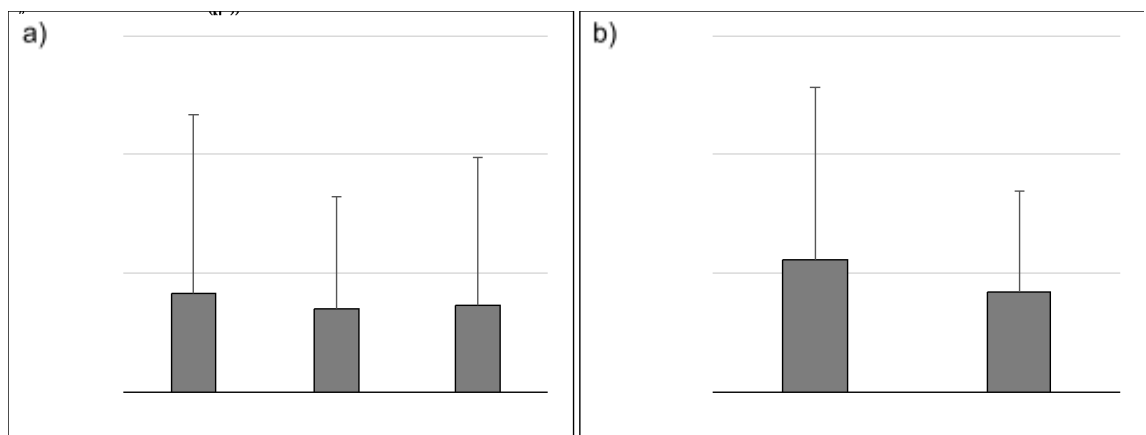


Figura 18. Volumen medio y desvío estándar de néctar medido en las flores de trébol rojo en diferentes fechas (a) y momentos del día (b).

#### 4.3.5. Origen botánico de las muestras de polen y néctar

El trébol rojo estuvo presente en todas las muestras de polen corbicular oscilando entre 32% y 52%. Se encontró una relación con respaldo estadístico marginal entre éstas proporciones y la fecha del muestreo ( $F= 4,08$ ;  $P= 0,0555$ ), siendo mayor la proporción entre el 8 y el 23 de enero, cuando el número de inflorescencias receptivas del trébol rojo fue importante (Figura 19a).

Los granos de polen de trébol rojo fueron identificados en todas las muestras de néctar en proporciones que oscilaron entre 19 % y 52 %. Se encontró que esa variación estaba relacionada con las diferentes fechas en las que se tomó la muestra ( $F= 2,60$ ;  $P= 0,0480$ ). Al igual que en las muestras de polen corbicular, los abejorros explotaron el trébol rojo como recurso nectarífero entre el 8 y 23 de enero (Figura 19b).

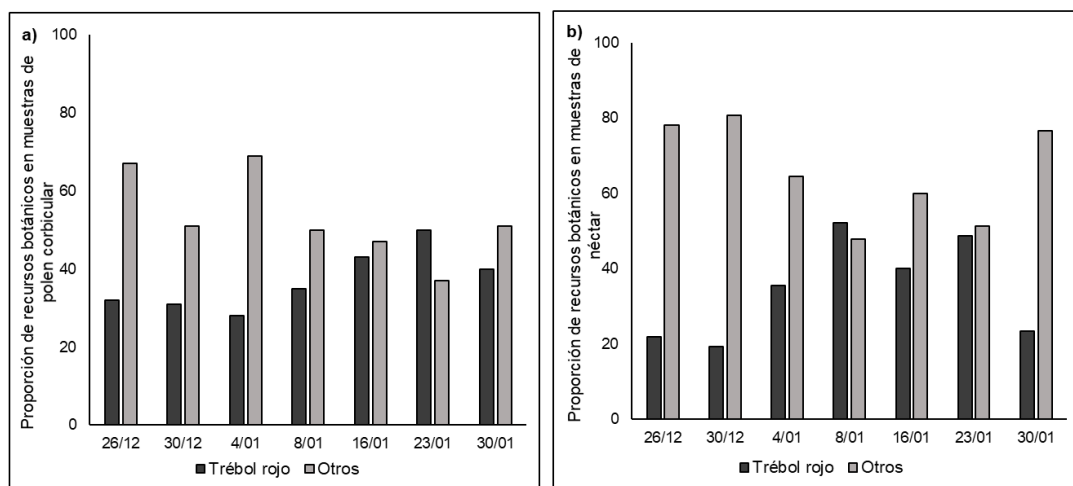


Figura 19. Proporción de trébol rojo y otros recursos botánicos encontrados en las muestras de polen corbicular (a) y de néctar (b).

Al analizar la entrada de trébol rojo como recurso polinífero se encontró que era más utilizado en la tarde que en la mañana ( $F= 72,23$ ;  $P= 0,0001$ ) (Figura 20).

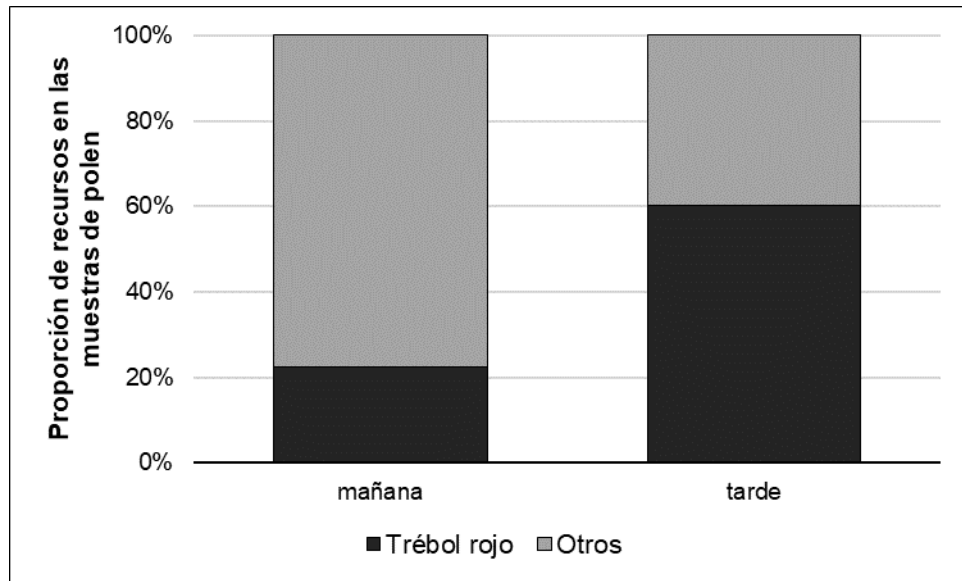


Figura 20. Utilización de recursos botánicos durante la mañana y la tarde. Se muestran el total de registros durante el período de estudio.

Al comparar la utilización de trébol rojo como recursos poliníferos y nectaríferos en los nidos que contaban con suministro de jarabe o no, se encontró que en este último grupo los abejorros explotaron en mayor proporción el recurso (polen:  $\chi^2 = 8,12$ ;  $P = 0,044$ ; néctar:  $\chi^2 = 13,97$ ;  $P = 0,0002$ ).

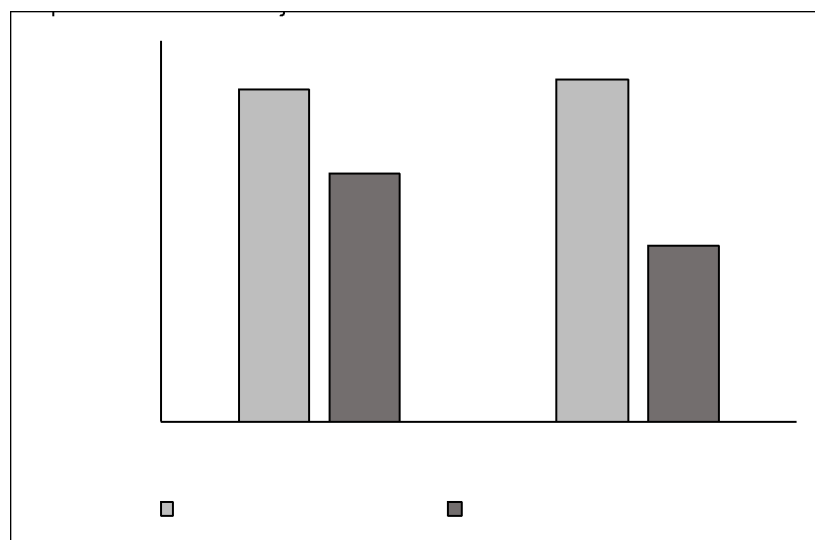


Figura 21. Proporción media de trébol rojo en las muestras de polen y néctar de las colonias de abejorros con y sin suplemento de jarabe.

Además del trébol rojo se identificaron 29 especies vegetales diferentes (agrupadas como “otros recursos”), las cuales pertenecen a 15 familias botánicas (Tabla 1). En algunos casos no se pudo determinar el nivel taxonómico más allá de la familia, pero se pudo constatar palinológicamente la diferencia entre especies.

Del listado de especies vegetales utilizadas, 22 fueron explotadas como recursos nectaríferos y 14 como recursos poliníferos. En general, los más destacados fueron: el trébol blanco (*Trifolium repens*), lotus (*Lotus spp.*), solanáceas (*Solanaceae spp.*), mirtáceas nativas (en su mayoría Guayabo del país (*Acca sellowiana*)) y eucaliptos (*Eucalyptus spp.*).

Tabla 1. Especies botánicas encontradas en las muestras de polen y néctar analizadas.

Familia	Nombre común	Taxa	Polen	Néctar
Apiaceae	-			✓
Arecaceae	Palmera	-		✓
Asteraceae	Achicoria	<i>Cichorium intybus</i>	✓	✓
	Cardo	<i>tipo I</i>	✓	
		<i>tipo II</i>	✓	
	Chirca	<i>Baccharis spp.</i>		✓
	Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>	✓	✓
	Picris	<i>Picris echioides</i>	✓	
Brassicaceae	Rábano	<i>Raphanus raphanistrum</i>		✓
Fabaceae	Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	✓	
	Cina cina	<i>Parkinsonia aculeata</i>		✓
	Ibirapita	<i>Peltophorum dubium</i>		✓
	Lotus	<i>Lotus spp.</i>	✓	✓

	Ñapinda	<i>Acacia bonariensis</i>		✓
	Pata de vaca	<i>Bauhinia candicans</i>	✓	
	Trébol blanco	<i>Trifolium repens</i>	✓	✓
	Trébol rojo	<i>Trifolium pratense</i>	✓	✓
Liliaceae			✓	
Myrtaceae	Eucalipto	<i>Eucalyptus spp.</i>	✓	✓
	Myrtaceae nativa	<i>Acca sellowiana</i>	✓	✓
Oleaceae	Ligustro	<i>Ligustrum lucidum</i>		✓
Pinaceae	Pino	<i>Pinus sp.</i>		✓
Poaceae	Maíz	<i>Zea mayz</i>		✓
	Pasto	-		✓
Polygonaceae	-	-		✓
Rosaceae	-	-		✓
Rutaceae	Citrus	<i>Citrus sp.</i>		✓
Scrophulariaceae	-	-		✓
Solanaceae	Revienta caballo	<i>Solanum sisymbriifolium</i>	✓	

#### 4.3.6. Presencia de abejorros y abejas melíferas en el semillero

Por medio de un Modelo Lineal General se analizó la distribución de los abejorros en las parcelas de acuerdo a la distancia de los nidos, la fecha y el momento del día. También se realizó el mismo análisis con las abejas melíferas, que se observaron en alto número, seguramente debido a la presencia de dos apiarios (unas 40 colmenas en total) a aproximadamente 400 m del semillero, uno a cada lado.

La distribución de los abejorros estuvo determinada por la ubicación de los nidos ( $F= 9,88$ ;  $P< 0,0001$ ), siendo mayor la presencia a los 10 metros de distancia con una disminución hacia las parcelas más distantes. Esto se observó tanto en las obreras de abejorros que se encontraban colectando polen ( $F= 3,86$ ;  $P= 0,023$ ) como en las que colectaban néctar ( $F= 8,52$ ;  $P= 0,003$ ) (Figura 22). *Apis mellifera* por su parte, mostró una distribución uniforme en todo el semillero ( $F= 0,4$ ;  $P= 0,86$ ), patrón que se dio de igual

forma en individuos que estaban colectando polen o néctar ( $F= 1,24$ ;  $P= 0,29$  y  $F= 2,18$   $P= 0,11$ , respectivamente).

Al analizar la presencia de abejorros en el semillero a lo largo del período de estudio no se encontraron diferencias significativas, el número de individuos fue similar en todas las fechas ( $F= 1,79$ ;  $P= 0,103$ ) independientemente del recurso que estuvieran juntando (polen o néctar) ( $F= 1,22$ ;  $P= 0,29$  y  $F= 1,19$ ;  $P= 0,31$ , respectivamente). Esto no ocurrió en *A. mellifera*, ya que a partir del 30 de diciembre comenzó a registrarse un aumento en el número de abejas melíferas pecoreando sobre el trébol rojo ( $F= 16,81$ ;  $P < 0,0001$ ), ya sea en colectoras de polen o néctar ( $F= 15,32$ ;  $P < 0,001$ ;  $F= 2,41$ ;  $P= 0,02$ ).

En cuanto a la presencia de ambas especies en los diferentes momentos del día, se observó que los abejorros pecorearon sobre el trébol indistintamente en la mañana y en la tarde ( $F= 3,71$ ;  $P= 0,05$ ) independientemente el recurso que utilizarán, polen ( $F= 1,44$ ;  $P= 0,23$ ) o néctar ( $F= 3,25$ ;  $P= 0,07$ ). Nuevamente, en *A. mellifera* se obtuvieron resultados diferentes, encontrándose diferencias en el horario de mayor presencia en las parcelas, siendo éstas más abundantes en la tarde que en la mañana ( $F= 26,09$ ;  $P < 0,0001$ ) ya sea en colectoras de polen o no ( $F= 20,07$ ;  $P < 0,001$ ;  $F= 8,37$ ;  $P= 0,0043$ ) (Figura 22). No se encontró interacción entre fechas y horarios en la presencia abejorros ( $F= 0,70$ ;  $P= 0,6490$ ) en el semillero pero si para abejas melíferas ( $F= 15,95$ ;  $P < 0,0001$ ).

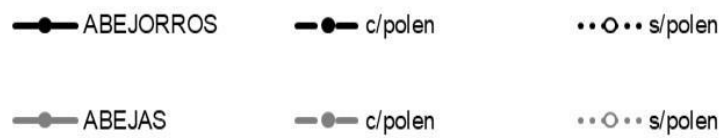
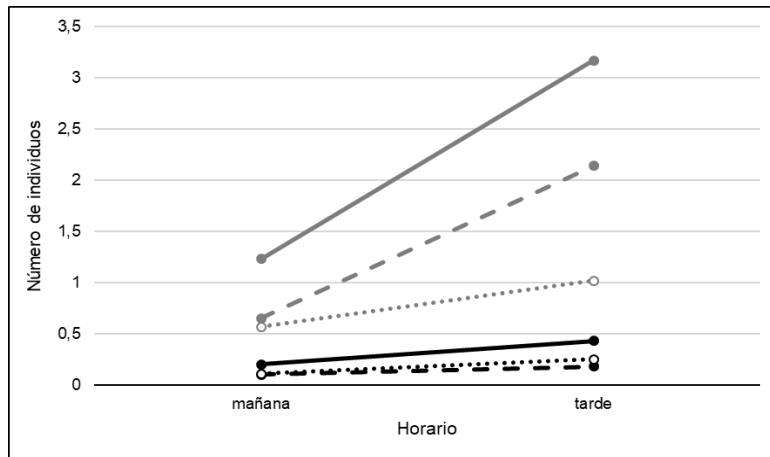
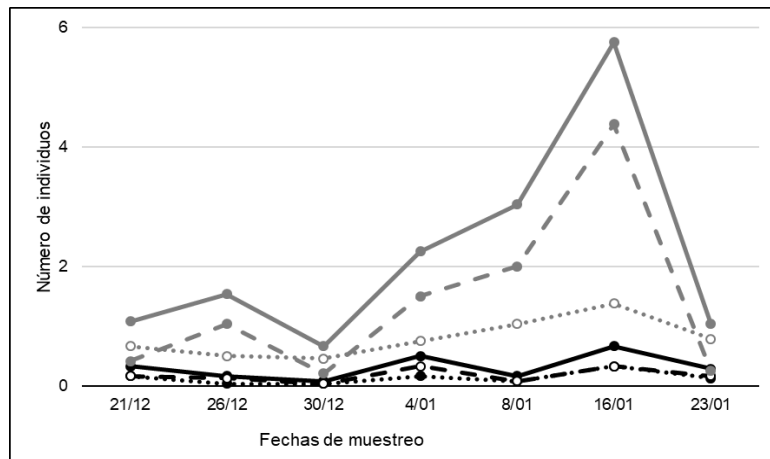
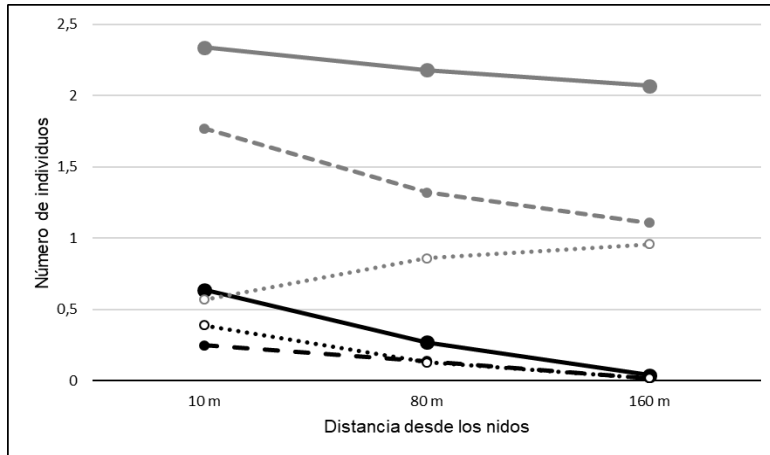


Figura 22. Presencia de abejorros y abejas melíferas en las parcelas de observación en relación a la distancia de los nidos de abejorros (arriba), a las fechas de muestreo (medio) y al momento del día (abajo). El número de individuos esta expresado como la media de abejorros y abejas melíferas registrados.

En cuanto a la relación entre abejorros y abejas melíferas, se pudo constatar una relación negativa entre los abejorros, ya sea con carga de polen como sin carga, sólo con el grupo de abejas melíferas que estaban pecoreando néctar ( $r = -0,73$ ;  $P = 0,006$  abejorros con polen,  $r = -0,68$ ;  $P = 0,001$  sin carga de polen). Para profundizar en la distribución de los abejorros y las abejas melíferas se realizó un análisis para ver si el número de inflorescencias receptivas tenía algún efecto y se obtuvo que los primeros no se distribuyeron de acuerdo a ésta variable ( $F = 1,77$ ;  $P = 0,1871$ ). Sin embargo, la presencia de las abejas melíferas si estuvo influenciada por la oferta de inflorescencias receptivas ( $F = 88,99$ ;  $P < 0,0001$ ). De forma complementaria se realizó un coeficiente de correlación parcial corregida por el número de inflorescencias receptivas y se obtuvo una correlación negativa entre ambos ápidos la que resultó estadísticamente no significativa ( $r = -0,58$ ;  $P = 0,11$ ).

#### 4.3.7. Presencia de otros polinizadores en el semillero

Los polinizadores registrados en las parcelas de observación y que se vieron en contacto con las estructuras florales del trébol rojo pertenecen a cuatro Ordenes: Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera. En este último grupo, al que pertenecen los abejorros y las abejas melíferas, se identificaron dos especies del género *Xylocopa*, *Xylocopa augusti* y *Xylocopa frontalis*. Además, se encontró una especie de avispa de la familia Vespidae aún sin identificar (Figura 23).

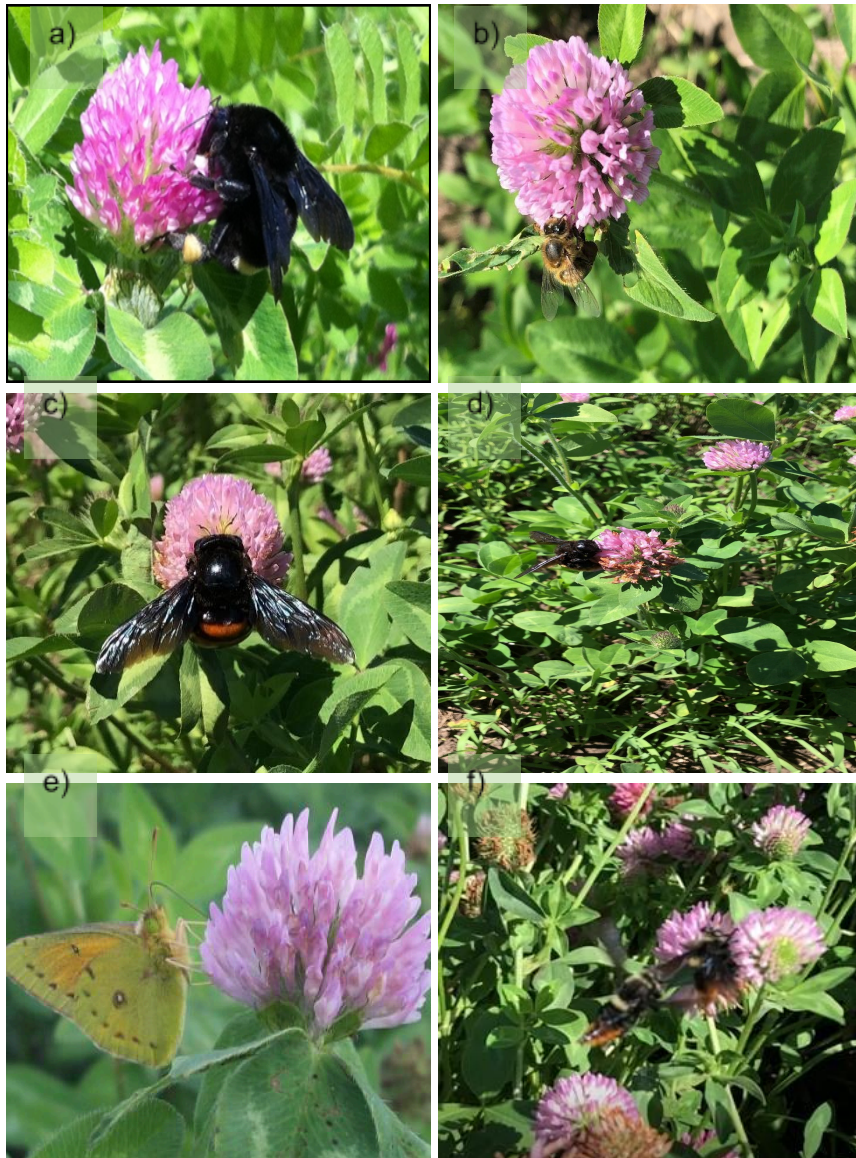


Figura 23. Diferentes especies de insectos observados en las parcelas de trébol rojo. a) *Bombus atratus*, b) *Apis mellifera*, c) *Xylocopa frontalis* d) *Xylocopa augusti*, e) *Colias lesbia*, f) *Mallophora ruficauda*.

La mayoría de los insectos registrados en contacto con las estructuras florales de trébol rojo no mostraron un patrón de presencia claro a lo largo del período de estudio. Dentro de los himenópteros observados, las abejas melíferas fueron los insectos más representados, especialmente en la segunda mitad del período de floración con una alta relación con el número de inflorescencias receptivas. Considerando que se colocaron colonias de

abejorros con un número importante de individuos, llamas la atención que éstos hayan sido observados en baja frecuencia en el semillero. Por otro lado, las xilocopas, *X. frontalis* y *X. augusti*, ésta última en menor frecuencia, estuvieron presentes en la segunda mitad del período de floración del cultivo. Las avispas *Bruchophagus gibbus* y una especie de la familia Polistinae aparecieron de forma muy esporádica. Los lepidópteros representados por las especies *Colias lesbia*, *Danaus erippus* y una especie del género *Epinotia*, aparecieron de forma regular en todos los registros menos el primero y el último. Los dípteros de la familia Syrphidae fluctuaron mucho a lo largo del período de floración, siendo el grupo con mayor presencia después de las abejas melíferas. Entre los coleópteros se observaron varias especies de la familia Chrysomelidae, siendo la especie más abundante *Diabrotica speciosa*, especie fitófaga generalista muy común en diversos cultivos. También se registraron apariciones puntuales de una mariquita de San Antonio del género *Eriopes* (Coccinellidae). Por último, se observó un número elevado de *Mallophora ruficauda*, el conocido moscardón cazador de abejas. Estos insectos se encontraban posados en diferentes partes de la planta esperando a sus presas y en algunas oportunidades se encontraron sobre las inflorescencias (Figura 24).

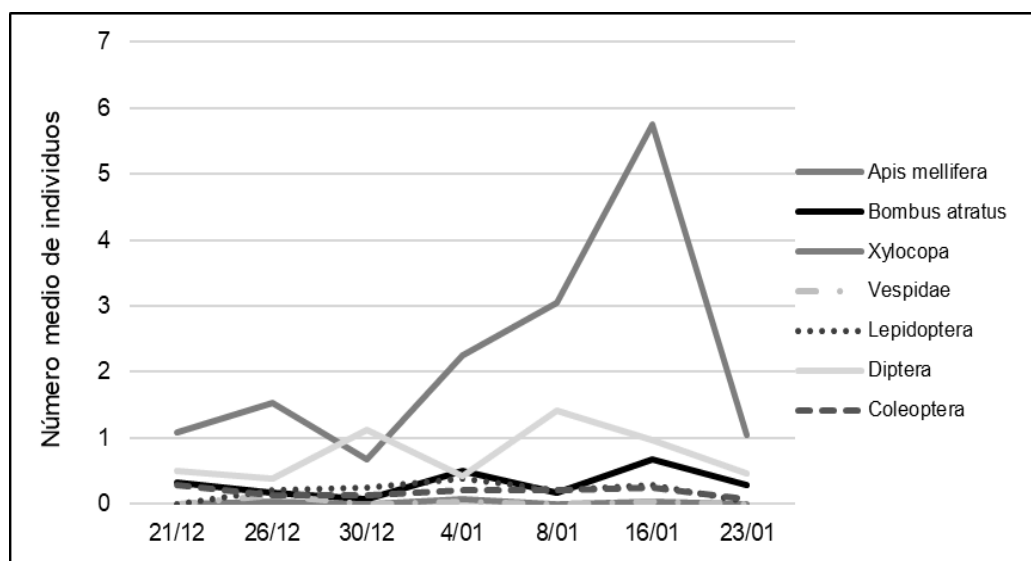


Figura 24. Presencia de los diferentes grupos de insectos observados interactuando con las inflorescencias del trébol rojo en las parcelas a lo largo del período de estudio.

#### 4.3.8. Rendimiento de semillas

Para cada una de las 12 parcelas experimentales se obtuvieron indicadores de rendimiento de la producción de semillas (inflorescencias maduras, peso limpio, kg/ha, número de semillas por cabezuelas, número de cabezuelas por metro cuadrado, entre otros indicadores) (Tabla 2).

Tabla 2. Indicadores de rendimiento de la producción de semillas de trébol rojo para cada parcela experimental a diferentes distancias: número de inflorescencias maduras, peso limpio, rendimiento medido en kg/ha, peso de 100 semillas, número de semillas por cabezuela y número de cabezuelas por m<sup>2</sup>.

P	Dist. (m)	Inf mad	kg/ha	P100 sem	Sem/cab	Cab/m <sup>2</sup>
1	10	777	950	0,1942	47,9	1022
2	10	675	771	0,183	47,4	888
3	10	557	530	0,1767	41,0	733
4	10	638	586	0,2025	34,5	839
5	80	596	517	0,207	31,8	784
6	80	550	414	0,1991	28,7	724
7	80	513	417	0,1999	30,9	675
8	80	417	343	0,2117	29,6	549
9	160	473	344	0,206	26,8	622
10	160	511	308	0,2005	22,8	672
11	160	395	293	0,2129	26,5	520
12	160	521	365	0,2002	26,6	686

Los resultados obtenidos muestran que el rendimiento (kg/ha), el número de semillas por inflorescencias, el número de inflorescencias por metro cuadrado y el peso de 1000 semillas fueron los indicadores que presentaron diferencias en relación a la distancia de los nidos. De estos

indicadores, el rendimiento (kg/ha) y el número de semillas por inflorescencia fueron los que presentaron mayor valor en las parcelas ubicadas a 10 metros de los nidos de abejorros (rendimiento:  $F= 11,13$ ;  $P= 0,0037$ ; número de semillas por inflorescencias ( $F= 20,55$ ;  $P= 0,004$ ) (Figura 25). Lo mismo ocurrió con el número de inflorescencias por metro cuadrado obteniéndose una media de  $870,5 \pm 119,9$  en las parcelas cercanas a los nidos, valor mayor que lo que se registró en las parcelas ubicadas a 80 y 160 metros de los nidos (media:  $683,9 \pm 84$ ; media:  $625 \pm 75,2$ , respectivamente) ( $F= 6,58$ ;  $P= 0,01$ ). Cabe destacar que esta variable depende de la característica del cultivo y no del proceso de polinización. En el caso del peso de 1000 semillas también se presentaron diferencias significativas, obteniendo el menor valor en las parcelas próximas a los nidos de abejorros ( $0,19 \pm 0,01$ ) frente a las otras dos distancias ( $0,20 \pm 0,01$  iguales para 80 y 160 metros) ( $F= 4,76$ ;  $P= 0,039$ ).

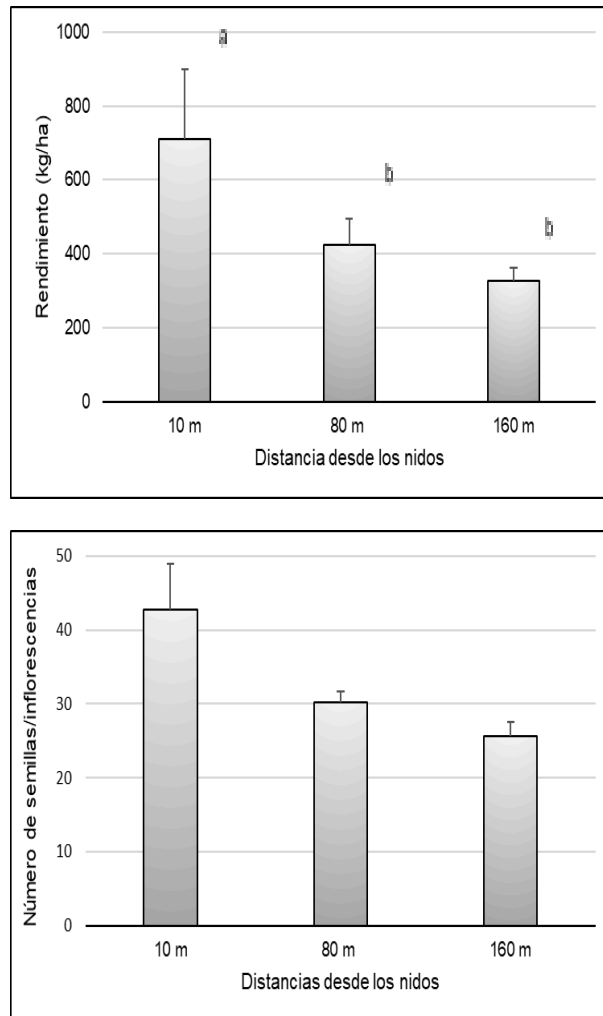


Figura 25. Rendimiento (kg/ha) (arriba) y número de semillas por inflorescencias (abajo) obtenido en las parcelas de trébol rojo a tres distancias diferentes de los nidos de abejorros.

#### 4.3.9. Relación entre el rendimiento de semillas y presencia de abejorros

Utilizando el Coeficiente de Correlación de Pearson, se determinó la asociación de los diferentes indicadores de rendimiento con el número de abejorros registrados sobre las parcelas. Se encontró una asociación positiva entre el número de abejorros y el número de semillas/inflorescencia ( $r= 0,73$ ;  $P= 0,007$ ) y el rendimiento medido en kg/ha ( $r= 0,58$ ;  $P= 0,04$ ). Se aplicó un Modelo Lineal General para determinar la relación entre la presencia de los abejorros en las parcelas y el rendimiento de semillas de

trébol rojo obteniéndose la función Rendimiento (kg/ha) = 362,58 + 394,36 abejas (F= 10,14; P= 0,01) (Figura 26). Con respecto al número de inflorescencias por metro cuadrado no se encontró relación positiva con el número de abejas (r= 0,52; P= 0,08). Finalmente se encontró una relación negativa entre la presencia de abejas y el peso de 1000 semillas (r= -0,075; P= 0,0043).

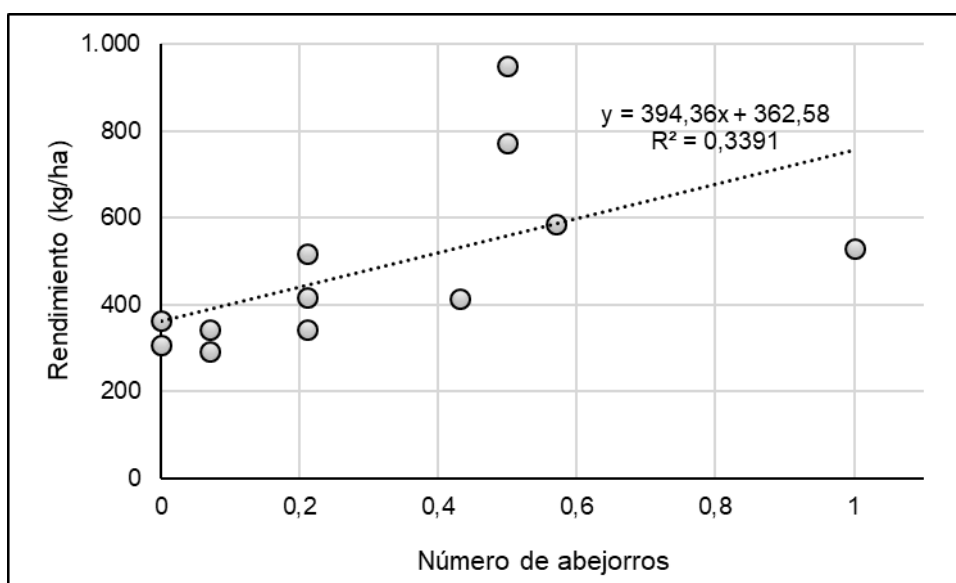


Figura 26. Relación entre el número medio de abejas y el rendimiento de semillas (kg/ha) obtenido a partir del registro de las 12 parcelas de observación en el semillero de trébol rojo.

En el caso de las abejas melíferas, el polinizador más abundante observado sobre el trébol rojo, no se pudo encontrar una asociación significativa ni con el número de semillas/inflorescencia (r= 0,23; P= 0,47), ni con el rendimiento (kg/ha) (r= 0,46; P= 0,12). Al igual que con los abejorros, se aplicó un Modelo Lineal General encontrando que no hubo relación entre el número de abejas melíferas y el rendimiento obtenido (F= 2,82; P= 0,12). Cabe destacar que este insecto no se relacionó con ningún indicador de rendimiento medido.

De forma complementaria, con el fin de esclarecer el papel de *A. mellifera* como polinizador se analizó el efecto de ambos polinizadores juntos sobre el rendimiento de semillas de trébol rojo. Los resultados arrojaron que ambos polinizadores contribuyeron en el rendimiento (kg/ha) obtenido ( $F=7,76$ ;  $P=0,01$ ) siguiendo una relación  $\text{rendimiento} = -121,5 + 438,5 \text{ abejorros} + 214,07 \text{ abejas melíferas}$ , con un coeficiente de determinación  $R^2$  de 0,63 (mucho mayor que la suma de cada polinizador por separado). En este contexto, *A. mellifera* se relaciona con el rendimiento obtenido ( $F=7,22$ ;  $P=0,02$ ).

#### 4.3.10. Producción de semillas en las carpas

Se realizó un análisis de varianza y en general los resultados de rendimientos en las carpas, incluyendo el tratamiento “sin polinizadores”, y no encontraron diferencias significativas sobretodo en kg/ha y número de semillas por cabezuela ( $F=202,96$ ;  $P=0,0006$ ,  $F=196,28$ ;  $P=0,0007$ , respectivamente). Enfocándonos específicamente en la acción de los polinizadores, abejorros y abejas melíferas, no se encontró diferencias en las medias para la mayoría de los indicadores de rendimientos de trébol rojo cuantificados (proporción de semillas por inflorescencias, kg/ha, número de inflorescencias maduras, peso de 1000 semillas, porcentaje de germinación), salvo en el número de inflorescencias/m<sup>2</sup>. Este último indicador presentó un valor medio menor en las carpas de abejas melíferas indicando que la floración de trébol rojo era menor. En ambos casos se obtuvieron muy buenos resultados lográndose un 556 kg/ha y un 55 % de semillas por cabezuela con abejorros y 487,5 kg/ha y 54,7% de semillas/cabezuelas con abejas melíferas (Figura 27).

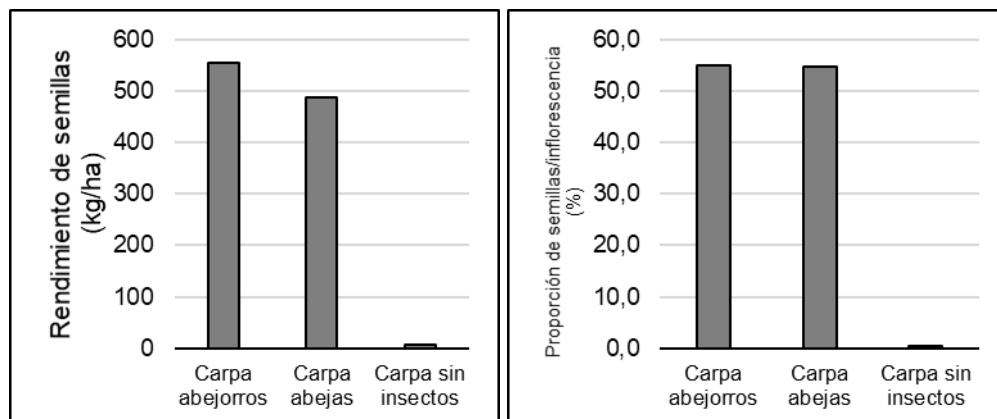


Figura 27. Rendimiento (kg/ha) y proporción de semillas por inflorescencias (%) obtenido en las carpas de experimentación donde se establecieron tres situaciones: con abejorros, con abejas melíferas y sin polinizadores.

#### 5.4. DISCUSIÓN

El estudio realizado constituye el primero en la región donde se busca incrementar el rendimiento de semillas de trébol rojo utilizando colonias de abejorros obtenidas mediante cría artificial en un periodo que no es el natural para la especie utilizada.

Se obtuvieron una diversidad de resultados relacionados con la actividad de los abejorros, el desarrollo de los nidos, los recursos nectaríferos y poliníferos colectados, la presencia de otros insectos polinizadores en el semillero y diferentes indicadores de rendimiento de semillas, que constituyen una información fundamental para continuar explorando la viabilidad de mejorar la producción de semillas de trébol rojo empleando abejorros como polinizadores principales.

##### 4.4.1. Evolución de las colonias de abejorros

La población de abejorros en los nidos fue decreciendo desde el momento que se instalaron las colmenas, alcanzando un mínimo el 16 de enero, momento en que el semillero mostraba la mayor cantidad de inflorescencias receptivas para los insectos. Esta disminución puede

obedecer a un recambio poblacional, ya que luego de esa fecha la población comenzó a recuperarse. Salvarrey *et al.* (2013) establecieron que el ciclo de cría de las obreras de *B. atratus* en colonias criadas en el laboratorio puede durar 37 días. Sin embargo, en estudios similares con la misma especie en zonas tropicales se halló que el ciclo de cría de las obreras duraba entre 24 y 33 días (Torres y Gómez, 2009; Cruz *et al.*, 2008). Estos valores de duración del ciclo de cría podrían explicar la variación poblacional de las colonias, ya que el 23 de enero, 31 días después de instalados los nidos, el número de individuos comenzó a aumentar, llegando a un valor similar a la inicial.

Por otro lado, luego de instalación de los nidos en el semillero no se observó una pérdida abrupta de individuos, tal como lo reportaron Salvarrey *et al.* (2017). Estos investigadores, que trabajaron con colonias naturales trasegadas a cajones, registraron pérdidas del 25% de individuos el primer día de instaladas en el campo. En este estudio las colonias fueron obtenidas mediante cría artificial y las obreras realizaron su primer vuelo al instalar las colmenas. Es posible que en estas condiciones mostraran una mejor adaptación y una orientación más efectiva al momento de retornar al nido.

Llamativamente, los nidos ubicados en el extremo sur de cada refugio (se instalaron cuatro nidos en cada uno), captaban un mayor número de abejorros que retornaban del campo en detrimento de los demás nidos. Esto hace suponer que la deriva de pecoreadoras entre los distintos nidos fue importante. La deriva es un fenómeno muy común en las abejas melíferas cuando las colmenas están muy cercanas, situación típica en apiarios de producción (Hicks, 2018; Gary, 1992). En este caso los abejorros también mostraron ese comportamiento y es un factor que se debe tener en cuenta cuando se planea utilizarlos para la polinización de un cultivo.

#### 4.4.2. Ritmo de actividad de los abejorros

El registro de los abejorros entrando y saliendo de las colonias presentaron variaciones a lo largo del período de estudio pero sin un patrón

fijo, y no se encontró relación entre la actividad y la temperatura o la humedad. Las condiciones ambientales pueden influenciar el forrajeo de los abejorros (Bergman *et al.*, 1996). Sin embargo si las variaciones se dan a nivel diario podrían no afectar su actividad de pecoreo (Ogilvie *et al.*, 2017).

Los abejorros mostraron mayor actividad en la mañana que en la tarde. Coincidentemente, durante la mañana es cuando los abejorros colectan mayor cantidad de polen y de más diverso origen. Así, la mayor actividad de los abejorros durante la mañana podría deberse a una mayor disponibilidad de polen.

Un aspecto que llama la atención es que la colecta de polen en el periodo de estudio fue aumentando mientras que el número de individuos de las colonias fue disminuyendo. Los días de mayor entrada de (8 y 23 de enero) coinciden con el menor número de individuos en los nidos. El polen es un alimento esencial para el desarrollo de las larvas, por lo que su demanda puede mostrarse independiente del número de abejorros adultos y responder al número de larvas presentes en los nidos (Vanderplanck *et al.*, 2014). Como ya se mencionó, la población de las colonias comenzó a crecer luego de un declive inicial por lo que el mayor ingreso de polen fue destinado a la cría que luego restablecería la población.

#### 4.4.3. Utilización de recursos botánicos

El análisis palinológico de las muestras de polen y néctar colectadas por los abejorros, mostró una variación en el origen botánico de acuerdo al periodo de estudio (aunque en el polen con un respaldo estadístico marginal). Las muestras de polen mostraron menor variación y mayor proporción de trébol rojo (32-52 %) que las muestras de néctar (19- 52 %). Al analizar los recursos botánicos utilizados observamos que, además del trébol rojo, se utilizaron 29 especies botánicas. Dentro de esas especies, 14 fueron utilizadas como poliníferas y 22 como nectaríferas. Esto demuestra la magnitud de la competencia que tiene el trébol rojo para atraer a los abejorros, especialmente en fuentes de néctar.

Pese a que los abejorros ingresaban mayor cantidad de polen y de mayor diversidad de fuentes florales durante la mañana, fue en la tarde cuando colectaron en mayor proporción polen del trébol rojo. Este comportamiento pudo estar determinado por la oferta de recursos (Rotheray *et al.*, 2017; Goulson, 2003). La competencia y/ disponibilidad de los diferentes recursos vegetales pueden ser la explicación de la mayor presencia de ápidos en el semillero en la tarde, como se analiza a continuación.

#### 4.4.4. Presencia de los abejorros y abejas melíferas en el semillero

El análisis del número de abejorros registrados en las parcelas de trébol rojo, mostró un marcado gradiente decreciente en la distribución desde la ubicación de los nidos. Esta tendencia es coincidente con lo hallado por Varela y Rebuffo (1999), pero contraria a la reportada por Salvarrey *et al.* (2017). En este último estudio, realizado en marzo, cuando la población natural de abejorros alcanza su máximo, es altamente probable que la presencia de abejorros silvestres haya enmascarado un posible gradiente de distribución.

Por otro lado, no se encontró relación entre la presencia de abejorros en el semillero y las fechas de muestreo, ni con el momento del día. Esto indica que la actividad diaria de los abejorros sobre el trébol rojo fue uniforme y se mantuvo a lo largo de toda la floración. Esto llama la atención porque de acuerdo a los análisis palinológicos los abejorros colectaron más polen de trébol rojo en la tarde. Las abejas melíferas por su parte, superaron ampliamente a los abejorros en número y mostraron una distribución uniforme en todo el cultivo. Dicha distribución estuvo determinada por el número de inflorescencias atractivas, aspecto que no se observó en los abejorros. Por otro lado, llama la atención que las abejas melíferas colectoras de néctar hayan mostrado un comportamiento diferente a las colectoras de polen. Éstas, estuvieron más presentes en las parcelas más alejadas de los nidos de abejorros (160 metros) e iban disminuyendo en

abundancia al acercarse a los mismos. Sumado a esto, se encontró una correlación negativa entre abejorros y abejas melíferas colectoras de néctar, lo que podría indicar un escenario de competencia entre ambas especies (Müller, 2016).

Numerosos estudios han destacado a los abejorros por su superioridad al momento de explotar el trébol rojo por poseer una probóscide más larga que *A. mellifera* (Elbgami *et al.*, 2014; Heinrich, 1976; Free, 1970). *Bombus atratus* es una especie de abejorro catalogada como de “lengua larga” (Arbulo *et al.*, 2011). Se ha demostrado que esta característica morfológica es determinante al momento de explotar disponer un recurso nectarífero con corola profunda como es el caso del trébol rojo. *Bombus atratus*, al llegar a la profundidad de las corolas de trébol rojo podría dejar sin néctar las flores, disminuyendo la posibilidad de que otro polinizador pueda alimentarse (Elbgami *et al.*, 2014). Por otro lado, la eficiencia que le confiere la probóscide larga para explotar especies como el trébol rojo, le brinda gran velocidad de pecoreo, por lo que su acción podría determinar la presencia de otras especies, en este caso a las abejas melíferas (Salvarrey, 2012; Arbulo *et al.*, 2011).

#### 4.4.5. Presencia de otros polinizadores

Además de los abejorros, los polinizadores más frecuentes en el semillero fueron las abejas melíferas, la única especie exótica observada. También se registraron insectos de los órdenes Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Hymenoptera visitando las flores de trébol rojo.

Los ápidos sociales son ampliamente reconocidos como excelentes polinizadores debido a que colectan néctar y polen para acopiar en los nidos, lo que los obliga a visitar muchas flores. Muchas especies tienen el cuerpo cubierto de pelos ramificados donde se adhiere el polen y estructuras especializadas para cargarlo y transportarlo durante los vuelos de pecoreo. Dentro de este grupo las abejas melíferas que tienen dificultad para acceder al néctar de las flores de trébol rojo por el largo de la corola, visitaron el

semillero con mucha frecuencia luego del pico de floración (8 de enero), por lo que pudieron competir fuertemente con los abejorros (Dupont *et al.*, 2011).

Las xilócopas, representadas por las especies *X. frontalis* y *X. augusti*, tuvieron una presencia destacada en el cultivo. Este grupo, poco considerado en la polinización de cultivos comerciales, podría llegar a tener un efecto importante en la producción de semillas de trébol rojo, si se tiene en cuenta su tamaño (mayor que el de los abejorros) y que colecta tanto néctar como polen. Para aumentar la presencia de este grupo es fundamental que cuenten con lugares y materiales propicios para que construyan sus nidos, o incluso brindárselos (Lucia *et al.*, 2017).

Otros grupos que merece más atención como potenciales polinizadores son, por un lado, los sírfidos o moscas de las flores, cuya dieta depende del néctar y el polen (Stefanescu *et al.*, 2018; Rosado y Ormosa, 2013). Por otro lado, se encuentran los lepidópteros, quienes también se alimentan de néctar y poseen un aparato bucal especializado que los hace aumentar su eficiencia como polinizadores (Barrios *et al.*, 2016). Los demás grupos de insectos encontrados, dípteros y coleópteros posiblemente tengan un rol muy limitado como polinizadores en la medida que solo colectan néctar para el mantenimiento de los individuos y no visitan muchas flores.

#### 4.4.6. Rendimiento de semillas

##### 4.4.6.1. En las parcelas

El rendimiento promedio del semillero fue de 486 kg/ha, un valor bastante más elevado que los 119 kg/ha (rango: 45 a 255 kg/ha) que se obtenía históricamente (Varela y Rebuffo, 1999; García *et al.*, 1991).

No obstante, hubo una enorme variación de rendimiento dentro del semillero, hallando la mayor producción de semillas a 10 metros de distancia con respecto a los nidos de abejorros (709 kg/ha). A 80 y 160 metros de los nidos el rendimiento disminuyó de forma marcada (423 Kg/ha y 327 kg/ha, respectivamente).

El rendimiento de semillas obtenido en las proximidades de los nidos de abejorros se destaca entre valores de rendimiento reportados por otros países. Por ejemplo, en Polonia Wilczek y Æwintal (2008) encontraron valores de 688, 737 y 937 kg/ha, y en Serbia Tomiæ *et al.* (2014) encontraron valores promedio de 251 kg/ha para un año y 638 kg/ha para otro año con diferentes situaciones climáticas. En ambos casos se llegó a estos valores por la utilización de métodos alternativos a la polinización que incluye la estimulación foliar mediante microelementos y la aplicación de cobalto (Tomiæ *et al.*, 2014; Wilczek y Æwintal, 2008), resaltando la limitante de este proceso biológico en la producción de semillas. En Estados Unidos, se han realizado estudios de polinización de trébol rojo con abejorros, específicamente con las especies, *Bombus hortorum* y *Bombus ruderatus*, y se han obtenido rendimientos de semilla en torno a 600 kg/ha. Sin embargo, para obtener dichos resultados se utilizaron de 10 a 12 colonias por hectárea (FAO, 2018).

El número de semillas por inflorescencias promedio, fue de 32,9 %, pero también mostró variaciones acompañando el gradiente de distribución de los abejorros. Los mayores valores fueron los obtenidos en la cercanía de los nidos (42,7 %). Esta variable es un importante indicador de la acción de los abejorros como polinizadores de trébol rojo ya que la formación de semillas en una flor es producto de la acción individual del polinizador (Salvarrey *et al.*, 2017). En el presente estudio la proporción de semillas por inflorescencia fue mayor a la obtenida con abejas melíferas en Uruguay (Formoso, 2010), pero menor a la alcanzada con abejorros por Salvarrey *et al.* (2017) (64,4 %). La diferencia entre los datos de este estudio y los que reportaron Salvarrey *et al.* (2017) puede radicar en que en este trabajo el semillero estaba en su primera floración por lo que presentaba un elevado número de inflorescencias por superficie, lo que significa más flores para visitar por parte de los abejorros. En cambio, Salvarrey *et al.* (2017) trabajaron con un semillero en su segunda floración, con baja densidad de inflorescencias, y con una abundante población natural de abejorros.

El número de abejorros en el semillero tuvo una relación con el número de inflorescencias por metro cuadrado, que coincidentemente fue mayor en las parcelas cercanas a los nidos, lo que explica el alto rendimiento de semillas. Varela y Rebuffo (1999) en un estudio de polinización de trébol rojo con abejorros también encontraron que el rendimiento de semillas estaba asociado a la mayor densidad de inflorescencias. Para optimizar la colecta de recursos los abejorros suelen ir ocupando parches en función del tamaño de los mismos y la cercanía a los nidos (Heinrich, 2004; Goulson, 2003). El mayor rendimiento obtenido en las parcelas cercanas a los nidos está relacionado con el número de inflorescencias en las parcelas conjuntamente con la acción de los abejorros.

A diferencias de los indicadores anteriormente mencionados el peso de 1000 semillas guardó una relación negativa con la distancia a los nidos. Esta tendencia puede deberse a que en las cercanías de los nidos las flores de trébol rojo tuvieron mayor número de semillas, pero de menor tamaño. Esto responde a una inversión energética de la planta, que al ser fecundados sus dos óvulos, debe disminuir los recursos asignados a la formación de cada semilla. Aún así, el porcentaje de germinación de las semillas obtenidas en todo el semillero no presentó diferencias, demostrando que las diferencias de peso halladas no afectaron su viabilidad.

#### 4.4.6.2. En las carpas

La producción de semillas y la proporción de semillas por inflorescencia en las carpas no mostraron diferencias entre las que contaban con los abejorros o abejas melíferas como polinizadores. Este resultado, diferente al obtenido en el semillero, debe analizarse teniendo en cuenta el tamaño de las colonias de las dos especies. Durante el periodo de estudio las colonias de abejorros no superaron los 50 individuos en cada carpa. En cambio, los núcleos de abejas melíferas contenían entre 5000 y 8000 obreras. En estas condiciones de extrema desigualdad en la cantidad de insectos, la igualdad

en la producción de semillas valoriza especialmente el rol de los abejorros como polinizadores.

La producción de semillas promedio de las dos carpas que contaban con abejorros de 556 kg/ha, y la proporción de semillas por inflorescencias fue de 55 %. Este último valor fue mayor que el obtenido en las parcelas cercanas a los nidos (42,7 %) y más cercano a los obtenidos por Salvarrey *et al.* (2017) (64,4 %) en un semillero con alta densidad de abejorros.

Dada la biología reproductiva del trébol rojo, que requiere polinización cruzada, en las carpas con ausencia de polinizadores se esperaría obtener valores casi nulos de rendimiento. Sin embargo, se obtuvo un porcentaje de semillas por inflorescencias de 0,5 % y un valor de peso de semillas de 6 kg/ha. Estos resultados sugieren la presencia de algún polinizador que no fue observado, pudiendo haber entrado por una perforación del tejido o tratarse de insectos que quedaron atrapados y que fueron imperceptibles al momento de la instalación de las carpas. Estudios similares frente a este tipo de resultados reportaron la presencia de pequeños coleópteros los cuales contribuyeron a la polinización de trébol rojo (Rao *et al.*, 2007).

#### 4.4.6.3. Consideraciones finales

El estudio realizado mostró que el empleo de colonias de abejorros nativos *B. atratus* puede ser una biotecnología que colabore a superar la producción de semillas de una de las leguminosas forrajeras más importantes del país como es el trébol rojo.

Los resultados obtenidos brindan elementos a atender al momento de planificar futuros estudios en el tema, como son la evolución de la población de las colonias, el ritmo de actividad, los recursos botánicos que actúan como competencia del trébol rojo y la distancia de pecoreo, entre otros.

La disponibilidad de colonias de *B. atratus* de forma desestacionalizada y emplazadas en colmenas muy seguras para el manejo ya es una realidad en la región.

Se requieren futuros estudios confirmar el valor de los abejorros *B. atratus* como polinizadores del trébol rojo en más de un ambiente acompañados de estudios económicos que determinen la factibilidad de incorporar este nuevo manejo tecnológico en la producción de semillas.

Finalmente, el empleo de colonias de abejorros para polinizar trébol rojo en establecimientos privados requerirá la formación técnica de recursos humanos para que puedan manejar sin inconvenientes las colmenas.

## 5. CAPÍTULO 2. POLINIZACIÓN EN TOMATE (*SOLANUM LYCOSPERSICUM*) UTILIZANDO ABEJORROS NATIVOS (*BOMBUS ATRATUS*) COMO POLINIZADORES EN CULTIVO BAJO INVERNÁCULO.

### 5.1. INTRODUCCIÓN.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes del mundo. En Uruguay, el mercado interno se encuentra abastecido por una producción anual continua favorecida por la utilización de zonas con distinta aptitud agro-ecológica, la aplicación de diversas tecnologías y la producción de cultivos protegidos. La producción de tomate en invernáculos alcanza el 70 % del volumen total producido en el país (DIEA, 2018) y está creciendo en cuanto al número de productores y área cultivada en sustitución de la producción de tomate a campo. Las principales razones de esta tendencia son el mayor rendimiento y calidad obtenidos, que permite prolongar los ciclos productivos y controlar algunos factores ambientales.

Entre los factores que limitan un mejor rendimiento del tomate, producidos tanto a campo como bajo protección, se destacan la falta de polinización, las temperaturas desfavorables para la antesis, la iluminación insuficiente, el exceso o falta de nutrientes, y la humedad relativa que cuando es alta dificulta la liberación de granos de polen y cuando es baja obstaculiza la germinación del tubo polínico (Aldana *et al.*, 2007). Estudios a nivel local indican que el rendimiento de tomate depende principalmente del largo de ciclo de producción, seguido por el porcentaje de cuajado y en menor medida por el número de flores. El tamaño de fruto tiene menos impacto, pero es significativo. Sin embargo, la variable ambiental más importante en la determinación del rendimiento es la luz interceptada por el cultivo (Berrueta, comunicación personal). Algunas de estas limitantes son propias de la producción bajo cubierta y podrían ser superadas con la utilización de un polinizador eficiente que contribuya a la obtención de un mayor rendimiento.

Otro método para mejorar la producción de cultivo de tomate protegido, sin necesidad de recurrir a la polinización, es la utilización de reguladores de crecimiento (hormonas) (Astegiano *et al.*, 1982). Existen diversos reguladores y sus efectos sobre el rendimiento apuntan a favorecer la fructificación y tamaño de los frutos obtenidos (Martínez *et al.*, 2016). La aplicación exógena de auxinas induce un rápido prendimiento del ovario cuando la causa de la falta de cuajado está dada por la ocurrencia de temperaturas que se encuentran por debajo o exceden el óptimo requerido por el cultivo (Ramírez, 2003), favoreciendo también el crecimiento del fruto por el incremento en la biosíntesis de giberelinas a través de la actividad de enzimas involucradas en su metabolismo (Serrani Yarce, 2008). De esta forma, con la aplicación de hormonas en el cultivo de tomate se logra mayor cantidad de frutos y de mayor tamaño (Martínez *et al.*, 2016).

No obstante, el reemplazo de la polinización entomófila con polinización manual, polinizadores eléctricos u hormonas incrementa el trabajo en el cultivo y los costos de producción (Velthuis, 2002; Kaftanoglu, 2000). Además, es frecuente que esta técnica promueva la formación de frutos deformes que luego serán descartados.

Los beneficios del uso de abejorros como polinizadores del tomate radican, por un lado, en la disminución de costos al reemplazar otras técnicas de polinización o el uso de estimulantes de la fructificación, y por otro, en las mejoras obtenidas en la calidad de los frutos y en la producción total (Vethuis y van Doorn, 2006). Varias investigaciones han constatado que la polinización con abejorros mejora el cuajado de frutos (Velthuis y van Doorn, 2006; Morandin *et al.*, 2001b; van Ravestijn y van der Sande, 1991), aumenta el número de semillas, diámetro y peso (Nunes da Silva *et al.*, 2012; Aldana *et al.*, 2007; Estay *et al.*, 2001; Morandin *et al.*, 2001b; Dogterom *et al.*, 1998; van Ravestijn y van der Sande, 1991), favorece la formación de frutos más regulares y redondeados (Aldana *et al.*, 2007), y mejora los atributos químicos y sensoriales de los tomates (concentración de sólidos solubles, acidez, dulzura, aroma, volátiles) (Hogendoorn *et al.*, 2010).

Algunos productores de tomates preocupados por una mejora en la calidad del producto han incursionado en el uso de abejorros para la polinización, recurriendo a la importación de colonias de *B. atratus* obtenidas mediante cría artificial desde Argentina.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de los abejorros *B. atratus* en características del fruto de tomate considerando peso, diámetro, número de semillas y número de lóculos de los mismos, obtenidos a partir de flores polinizadas por dichos insectos.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Aspectos generales

Se realizaron tres experimentos en dos zonas del país en cultivos de tomate de mesa bajo cubierta, uno en el departamento de Canelones y dos en el departamento de Salto.

### 5.2.2. Experimento 1

En abril de 2015 se trabajó en la localidad de Sauce, en el departamento de Canelones (34° 66' S, 56° 12' W) en un cultivo de tomate (variedad LAPATAIA), plantado bajo un invernáculo con estructura de madera, con cubierta y laterales de polietileno. Estos últimos se levantan para controlar la temperatura y la humedad en el interior (invernáculo semi abierto), por lo que no se puede evitar el ingreso de insectos al cultivo. Se colocaron en el invernáculo dos colonias de abejorros de aproximadamente 60 individuos cada una, obtenidas mediante cría artificial en la Sección Etología de Facultad de Ciencias (Salvarrey *et al.*, 2013) (Figura 28).



Figura 28. Vista del cultivo de tomate variedad LAPATAIA donde se realizó el Experimento 1, Canelones 2015.

Las flores de tomate fueron sometidas a dos tratamientos: un grupo de flores fueron visitadas por los abejorros y otro grupo fue excluido de la vista de los insectos. Al inicio de la floración del quinto racimo se eligieron al azar 40 pares de plantas vecinas. En una de ellas se eligió una flor visitada por abejorros, la cual fue identificada por la observación directa de la mancha necrótica (marca que dejan los abejorros al visitar la flor) (Figura 29 a,b). En la planta vecina se eligió una flor no visitada por los abejorros, se la marcó y aisló mediante la utilización de una “bolsa” de tul (Figura 29 c). De esta forma se marcaron 40 flores por tratamiento.



Figura 29. Determinación de los tratamientos mediante observación directa de los abejorros visitando las flores de tomate (a) o por observación de la mancha necrótica (b) y exclusión de flores mediante la bolsa de tul (c).

Se registró la proporción de flores que llegaron a desarrollar frutos (cuajado), y cuando éstos cumplían con los requerimientos comerciales se los cosechó y se determinó el peso fresco, diámetro, número de semillas y número de lóculos (Figura 30).



Figura 30. Seguimiento del crecimiento del fruto de tomate desde el cuajado hasta el momento de la cosecha.

### 5.2.3. Experimentos 2 y 3

En julio en 2015 y en julio de 2016 se trabajó en departamento de Salto (31° 36' S, 57° 93' W). Se utilizaron cultivos de tomate (variedad ELPIDA) plantados en un invernáculo de tipo múltiple (modelo capilla), con estructura de metal, techo y laterales de polietileno y tejido anti-áfidos, conformando una estructura totalmente cerrada (Figura 31).



Figura 31. Vista exterior e interior del invernáculo de Salto donde se realizó el Experimento 2 y 3 (a) con la variedad ELPIDA.

En cada temporada se colocaron cuatro colonias de abejorros de *B. atratus* de aproximadamente 110 individuos producidas por la empresa Brometan (Argentina) (Figura 32).



Figura 32. Vista de los nidos de *B. atratus* instalados en el invernáculo.

Las flores de tomate fueron asignadas a tres tratamientos: un grupo de flores fueron visitadas por los abejorros, un segundo grupo fue excluido de la vista de los insectos y un tercer grupo recibió la aplicación de hormonas. Al inicio de la floración del quinto racimo se eligieron al azar 30 grupos de tres flores, cada una pertenecientes a plantas vecinas. En una de planta se eligió una flor visitada por abejorros, y en una de las plantas vecinas se eligió una flor no visitada por los abejorros la cual se marcó y aisló con una “bolsa” de tul, y en la otra planta vecina se marcó una flor y se le aplicó un estimulante de fructificación. La hormona aplicada fue ácido  $\beta$ -naftoxiacético (Tomatosa®) en la dosis 1 gramo por litro. De esta forma se obtuvieron 30 repeticiones de cada tratamiento.

Se registró la proporción de flores que llegaron a desarrollar frutos (cuajado), y cuando éstos cumplían con los requerimientos comerciales se los cosechó y se los llevó al laboratorio para determinar el peso fresco, diámetro, número de semillas y número de lóculos (Figura 33).

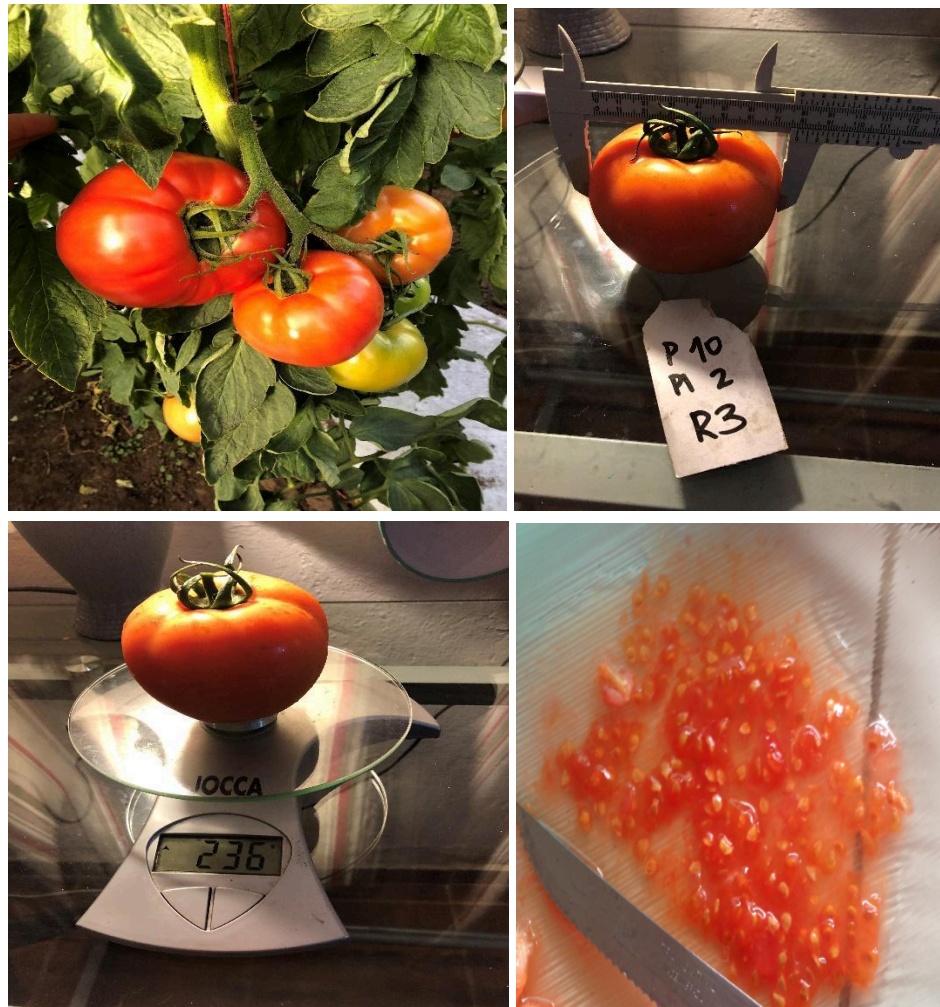


Figura 33. Determinación del ancho (mm), peso (gr) y número de semillas de los frutos de tomate.

#### 5.2.4. Análisis estadísticos

El número de frutos cuajados con los diferentes tratamientos se compararon mediante prueba de Chi cuadrado. Las diferentes características de los frutos de tomate fueron analizadas por separado empleando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por separación de medias por DMS (diferencias mínimas significativas) para las variables peso, diámetro, número de semillas y número de lóculos. La relación entre el número de semillas y el peso de los tomates se estudió mediante el coeficiente de correlación de Pearson y regresión lineal. Cabe aclarar que

para este análisis se excluyeron los frutos obtenidos mediante aplicación de hormonas.

En todos los análisis se consideró un nivel de significación de 0,05. Los análisis se realizaron empleando el programa estadístico InfoStat®.

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Experimento 1

El porcentaje de cuajado de las flores que fueron visitadas por abejorros fue del 95 %, mientras que el de las flores no visitadas fue de 77,5 %, siendo estas diferencias significativas ( $\chi^2= 5,16$ ;  $P= 0,05$ ). Los tomates obtenidos a partir de las flores visitadas por los abejorros presentaron mayor peso ( $F= 4,14$ ;  $P=0,05$ ), diámetro ( $F= 6,24$ ;  $P= 0,05$ ) y número de semillas ( $F= 11,47$ ;  $P= 0,01$ ) que los obtenidos de flores que no fueron visitadas por los insectos (Figura 34). Por otro lado, al analizar el número de lóculos, no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos ( $F= 0,40$ ;  $P= 0,53$ ). La temperatura y humedad relativa promedio registrada fue de  $18,1 \pm 1,9$  °C y  $65,8 \pm 6,9$  %, respectivamente.

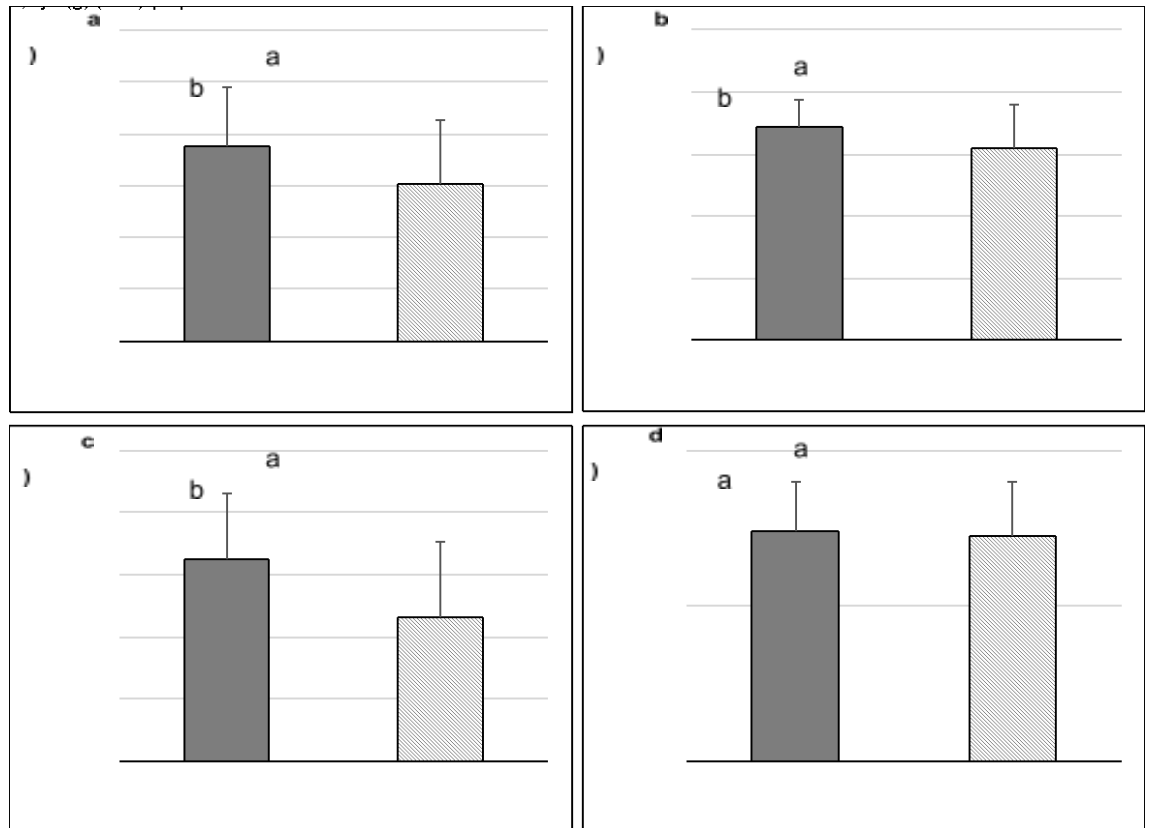


Figura 34. Medias de las diferentes características de fruto; peso fresco (a), diámetro (b), número de semillas (c) y número de lóculos (d), medidos en los frutos de tomates producidos a partir de flores visitadas por abejorros y no visitadas por polinizadores, en Canelones 2015. Diferentes letras (a,b) indican diferencias significativas a  $P < 0,05$ , en ANOVA.

### 5.3.2. Experimento 2

El porcentaje de cuajado de las flores que fueron visitadas por abejorros, el de las flores que no fueron visitadas por abejorros y el de las flores que recibieron hormonas fue de 100, 63,4 y 90 %, respectivamente, siendo estas diferencias significativas ( $\chi^2 = 18,9$ ;  $P < 0,05$ ).

Los tomates obtenidos a partir de las flores visitadas por los abejorros presentaron mayor diámetro que los obtenidos de flores que no fueron visitadas por los insectos ( $F = 3,73$ ;  $P < 0,05$ ), pero no de los obtenidos de flores tratadas con hormonas ( $F = 0,54$ ;  $P = 0,46$ ). Los tomates de estos

últimos dos tratamientos no mostraron diferencias ( $F= 2,19$ ;  $P= 0,15$ ). Los tomates de los tres grupos de tratamiento no mostraron diferencias significativas en el peso, número de semillas y número de lóculos ( $F= 1,99$ ;  $P= 0,15$ ,  $F= 0,80$ ;  $P= 0,45$ ,  $F= 1,41$ ;  $P= 0,25$ , respectivamente) (Figura 35).

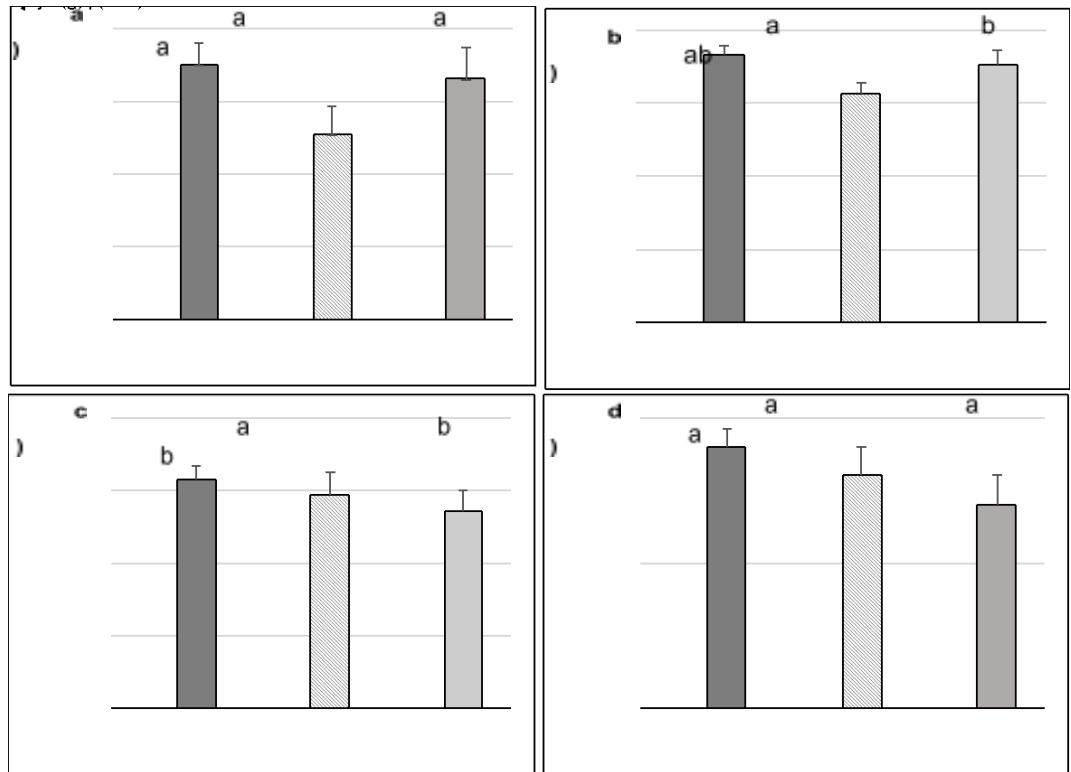


Figura 35. Medias de las diferentes características de fruto; peso fresco (a), diámetro (b), número de semillas (c) y número de lóculos (d), medidos en los frutos de tomates producidos a partir de flores visitadas por abejorros, no visitadas por polinizadores y en las que se aplicó hormona, en Salto 2015. Diferentes letras (a,b) indican diferencias significativas a  $P < 0,05$ , en ANOVA.

### 5.3.3. Experimento 3

El porcentaje de cuajado de las flores que fueron visitadas por abejorros, el de las flores que no fueron visitadas por abejorros y el de las flores que recibieron hormonas fue de 73, 60 y 60 %, respectivamente no

encontrando diferencias significativas ( $\chi^2= 1,47$ ;  $P= 0,48$ ).

Los tomates obtenidos a partir de las flores de los tres grupos de tratamientos presentaron diferencias significativas en peso ( $F= 5,21$ ;  $P< 0,01$ ), diámetro ( $F= 4,05$ ;  $P< 0,05$ ), número de semillas ( $F=3,40$ ;  $P< 0,05$ ) y número de lóculos ( $F= 3,96$ ;  $P< 0,05$ ). Los tomates procedentes de las flores visitadas por abejorros presentaron mayor peso, diámetro y número de semillas que las procedentes de flores no visitadas por los insectos o que recibieron hormonas. Los tomates de estos últimos dos tratamientos no mostraron diferencias en los indicadores señalados. En cuanto al número de lóculos solo los tomates procedentes de flores no visitadas por los abejorros y los procedentes de flores tratadas con hormonas mostraron diferencias significativas, siendo mayor estos últimos ( $F= 3,96$ ;  $P< 0,05$ ). Los tomates procedentes de flores visitadas por abejorros no mostraron diferencias significativas con los obtenidos de flores que recibieron hormonas ( $F= 2,97$ ;  $P= 0,09$ ), ni con los obtenidos de flores no visitadas por abejorros ( $F= 0,86$ ;  $P= 0,36$ ) (Figura 36).

La comparación de los resultados obtenidos en el invernáculo de Salto en las dos temporadas mostró una relación entre año y tratamiento ( $F= 4,25$ ;  $P< 0,05$ ).

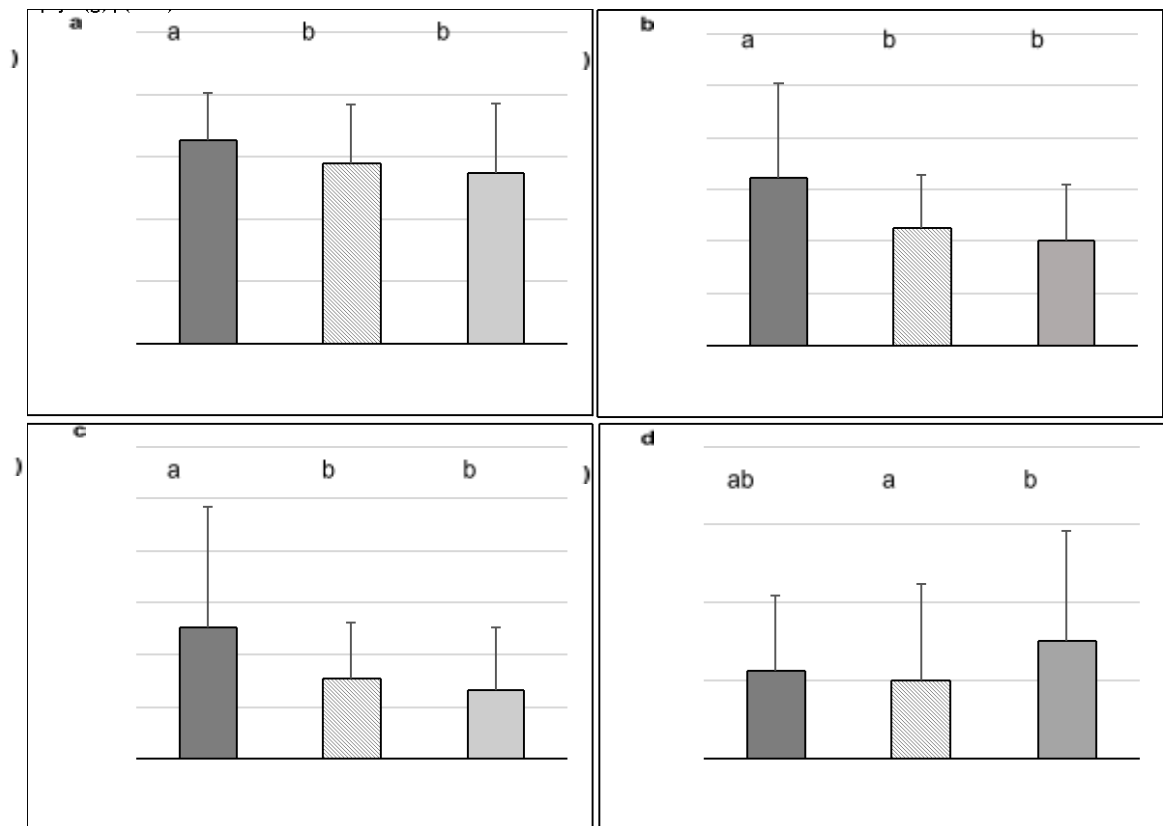


Figura 36. Medias de las diferentes características de fruto; peso fresco (a), diámetro (b), número de semillas (c) y número de lóculos (d), medidos en los frutos de tomates producidos a partir de flores visitadas por abejorros, no visitadas por polinizadores y en las que se aplicó hormona, en Salto 2016. Diferentes letras (a,b) indican diferencias significativas a  $P < 0,05$ , en ANOVA.

En consecuencia, se analizaron las condiciones ambientales de los invernáculos en las dos temporadas encontrándose diferencias significativas en la temperatura media ( $F = 13,26$ ;  $P < 0,001$ ), mínima ( $F = 33,20$ ;  $P < 0,001$ ) y máxima ( $F = 8,08$ ;  $P < 0,001$ ). En todos los casos la temperatura fue mayor en el año 2015 que en el 2016. En cuanto a la humedad media relativa, se encontraron diferencias significativas ( $F = 252,45$ ;  $P < 0,001$ ), presentando los 2015 menores valores de humedad relativa que el 2016 (Cuadro 1).

	2015				2016			
	Junio		Julio		Junio		Julio	
	Día	Noche	Día	Noche	Día	Noche	Día	Noche
<b>Temp (°C)</b>	19,5	15,0	18,6	13,9	17,6	10,7	16,2	11,9
<b>Húm. Rel. (%)</b>	61,7	82,4	75,6	91,5	80,5	93,6	84,3	94,2

Cuadro 1. Temperatura y humedad relativa (media) dentro del invernáculo para el día (06:00-18:59 hs) y la noche (19:00-5:59 hs) durante los meses de junio y julio en los años 2015 y 2016.

#### 5.3.4. Correlación entre número de semillas y peso

Se obtuvieron asociaciones significativas entre el número de semillas y el peso de los tomates de las dos variedades utilizadas en las dos zonas estudiadas, LAPATAIA (F= 38,21; P< 0,001) y ELPIDA (F= 101,5; P< 0,001) (Figura 37) y se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson siendo  $R^2= 0,37$ ;  $R^2= 0,51$ , respectivamente.

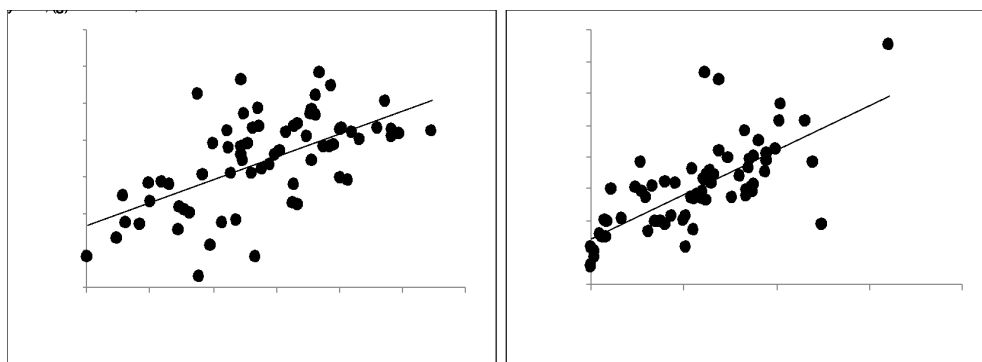


Figura 37. Asociación entre el número de semillas y el peso de tomates obtenidos mediante una regresión lineal simple para la variedad LAPATAIA (Experimento 1, izquierda) y la variedad ELPIDA (Experimentos 2 y 3 agrupando los datos, derecha).

#### 5.4. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en este estudio permiten determinar el efecto de la polinización por abejorros en el peso, diámetro, número de semillas y número de lóculos de tomates producidos bajo invernadero.

En primer lugar, la visita de los abejorros a las flores incrementó en los tres invernáculos el porcentaje de cuajado entre un 13 y 47 % en relación al obtenido en flores no visitadas por los insectos. Esto se encontró en los tres experimentos realizados y coincide con resultados reportados al utilizar otras especies de abejorros (Velthuis y van Doorn, 2006; Morandin *et al.*, 2001b; van Ravestijn y van der Sande, 1991). Cabe destacar que este componente de rendimiento es de suma importancia en la productividad del tomate, ya que el proceso de fructificación es el que determinará el número de frutos resultante.

La acción polinizadora de los abejorros también mejoró significativamente el peso, tamaño y número de semillas respecto a los frutos obtenidos de flores sin acceso a polinizadores. Esta mejora se observó claramente en los Experimentos 1 y 3, donde los tomates obtenidos a partir de flores polinizadas por abejorros presentaron valores superiores en todas las variables registradas, excepto en el número de lóculos.

El menor efecto de los abejorros en el invernáculo de Salto en el año 2015, a pesar de que la tendencia en los valores de los indicadores de rendimiento fue la misma que el de las otras dos experiencias, puede explicarse por condiciones ambientales que favorecieron la producción de tomates, que fueron mejores a las presentadas en el mismo invernáculo al año siguiente. Así, en el año 2015 la temperatura media se acercó al valor óptimo para la germinación del grano de polen, que es de 21 °C según Martínez *et al.* (2016), y la humedad relativa media estuvo en torno al 61 %, valor que favorece el cuajado y desarrollo del fruto (Vallejo, 1999). Estas condiciones muy favorables a la producción de tomates pudieron diluir el beneficio de la acción polinizadora de los abejorros. Sin embargo, si en este experimento consideramos conjuntamente el porcentaje de cuajado y el peso, las flores polinizadas por abejorros dan lugar a un mayor rendimiento

de tomates que las que solo se autopolinizaron (36,6 % más de frutos y 50 g más de peso). La mejora en el peso, tamaño y número de semillas de tomates en invernáculos debido a la utilización de diferentes especies de abejorros había sido verificada en varios estudios (Aldana *et al.*, 2007; Morandin *et al.*, 2001b; Estay *et al.*, 2001; Dogterom *et al.*, 1998; van Ravestijn y van der Sande, 1991).

En las dos experiencias realizadas en el invernáculo de Salto se incluyó el uso de un fitorregulador destacado por incrementar la fructificación y favorecer el desarrollo del fruto. Aun así, en el año 2016 las flores polinizadas por abejorros dieron lugar a tomates de mayor peso, tamaño y número de semillas que los provenientes de plantas tratadas con hormona. Estas diferencias no se encontraron en el año anterior, seguramente debido a las mejores condiciones ambientales para la producción mencionadas anteriormente pudieron favorecer el efecto del fitoregulador.

El uso de hormonas para mejorar el desarrollo de los tomates es una práctica frecuente en Uruguay, permitiendo conseguir frutos de buen tamaño y con mayor número de lóculos. Estos beneficios se corroboraron en este estudio, aunque no de forma clara al considerar los experimentos 2 y 3 realizados en Salto. En el experimento 2, los tomates obtenidos de flores tratadas con hormonas fueron de mayor tamaño que los obtenidos de flores no visitadas por abejorros, aunque estos últimos presentaban más semillas. En el experimento 3 se destaca el elevado número de lóculos que presentaron los tomates, pero con un bajo número de semillas. Estos resultados concuerdan con el reportado por Martínez *et al.* (2016), quienes señalaron que el uso de hormonas da lugar a numerosos lóculos pero vacíos, fenómeno que no ocurre con los tomates obtenidos de flores polinizadas por abejorros. Por otro lado, resalta la calidad de los tomates obtenidos de flores polinizadas por abejorros, los cuales mantuvieron sus cualidades independientemente de las condiciones ambientales.

En las tres experiencias realizadas se halló una asociación entre el número de semillas y el peso de tomate, con coeficientes de determinación

intermedios (37- 51 %), Esta asociación ya había sido hallada para otras variedades de tomates (Martínez *et al.*, 2016; Silva Neto *et al.*, 2013; Kevan *et al.*, 1991) y demuestra que la acción de los polinizadores aumentando el número de semillas de los tomates repercute en un mayor peso del fruto. Esto asociado a un mejor cuajado contribuye a mayores rendimientos del cultivo.

Además de la asociación con el peso del tomate, el número de semillas podría estar asociado a la cantidad de sólidos solubles, tal como se ha reportado para el tomate cherry (variedad Conchita) (Hogendoorn *et al.*, 2010). Estos investigadores también hallaron que los consumidores tienden a elegir tomates polinizados por poseer mejor sabor. En Uruguay aún resta estudiar el efecto de los polinizadores en la calidad sensorial de los tomates y si una mejora en este aspecto es percibida por los consumidores.

Los resultados encontrados en este estudio muestran que el uso de los abejorros nativos *B. atratus* pueden contribuir a una mayor eficiencia en la producción de tomates de las variedades LAPATIA y ELPIDA bajo invernáculo en dos regiones productivas del país. El mayor beneficio radica en la posibilidad de estabilizar la producción a lo largo de todo el año, incrementando efectivamente el porcentaje de cuajado en momentos críticos en el ciclo. Además, los frutos obtenidos presentaron mayor peso, mejorando el rendimiento de los cultivos. Esta mejora en productividad de tomates en invernáculos debido a la utilización de diferentes especies de abejorros había sido verificada en diferentes estudios (Aldana *et al.*, 2007; Estay *et al.*, 2001; Morandin *et al.*, 2001b; Dogterom *et al.*, 1998; van Ravestijn y van der Sande, 1991).

Este estudio es el primero en Uruguay que muestra los beneficios de utilizar abejorros nativos para mejorar la producción en tomates en invernáculos. La posibilidad de incorporar esta biotecnología está supeditada a la disponibilidad de colonias comerciales de abejorros y a un análisis costo/beneficio favorable.

## 6. EFECTO DE LA POLINIZACIÓN DE TOMATES CON ABEJORROS EN EL RENDIMIENTO Y LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS FRUTOS

### 6.1. INTRODUCCIÓN

Los abejorros del género *Bombus* son reconocidos polinizadores de tomates, tal es así que el proceso de domesticación de estos insectos fue originalmente pensado en la polinización de ese cultivo (Velthuis y van Door, 2006; Velthuis, 2002). La capacidad de generar las vibraciones necesarias para la liberación de polen de las solanáceas, familia que incluye el tomate, es la particularidad que hace de este grupo de abejas tan importantes en la producción de este fruto (De Luca y Vallejo-Marín, 2013).

Las dos especies de abejorros presentes en Uruguay, *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus*, han sido sujetas a experiencias de cría en cautiverio con resultados auspiciosos (Salvarrey *et al.*, 2013). El empleo de colonias de *B. atratus* obtenidas mediante cría artificial para polinizar tomates en invernáculo ha permitido mejoras sustanciales en cuanto a calidad y cantidad de frutos como se describió en el capítulo anterior. Si bien *B. atratus* y *B. bellicosus* comparten muchos aspectos comportamentales y morfológicos, hay diversos factores que pueden incidir en la eficiencia como polinizadores de cada especie, dependiendo del cultivo. Las especies de abejorros muestran diferentes preferencias por los recursos botánicos disponibles y esto está determinado por la disponibilidad de recursos alimenticios que ofrecen (polen y néctar) y por la capacidad de extraerlo por parte del abejorro (Morandin *et al.*, 2001a;b). En este sentido, se ha indicado que ambas especies de abejorros, *B. atratus* y *B. bellicosus*, utilizan en gran medida el polen de las solanáceas como recurso alimenticio (Salvarrey *et al.*, 2012; 2009).

En el estudio del capítulo anterior se encontró que el empleo de colonias de *B. atratus* utilizadas como polinizadores de tomate en invernáculo contribuían en términos generales a mejorar el porcentaje de

cuajado de las flores y el diámetro, peso y número de semillas de los frutos, coincidiendo con los resultados obtenidos en otros estudios (Aldana *et al.*, 2007; Estay *et al.*, 2001; Morandin *et al.*, 2001b; Dogterom *et al.*, 1998; van Ravestijn y van der Sande, 1991).

Sin embargo, en ese estudio no se registró el rendimiento total del cultivo contemplando todo el ciclo de floración. Este dato es importante teniendo en cuenta que la vida útil de las colonias en los invernáculos puede no superar las tres semanas (Vethuis y van Doorn, 2006). Por otro lado, la acción de los polinizadores puede influir sobre la fisiología de los frutos, afectando la jugosidad y la concentración de azúcar (Velthuis, 2002).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de los abejorros *B. bellicosus* en el rendimiento de tomate, considerando peso, diámetro y número de semillas de los frutos, y el impacto en textura y concentración de azúcar de los mismos.

## 6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.1. Aspectos generales

El estudio se realizó entre abril y agosto de 2019 en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Las Brujas, en el departamento de Canelones en un cultivo protegido de tomate de la variedad ELPIDA. La estructura del invernáculo era de madera, con cubierta y laterales de polietileno. Para evitar la salida de abejorros del invernáculo (normalmente se levantan los laterales durante el día) se cerró una superficie experimental de 120 m<sup>2</sup> con una malla. El cultivo dentro de esa superficie constaba de 16 parcelas de 10 plantas de tomate cada una. En el medio de este espacio se colocaron dos colonias de abejorros *Bombus bellicosus*, con aproximadamente 30 obreras. Estas colonias fueron obtenidas del trasiego de colonias silvestres a cajas nido (Figura 38).



Figura 38. Vista de la zona experimental del invernáculo.



Figura 39. Nido de *B. bellicosus* encontrado en el campo.

Se seleccionaron al azar dos conjuntos de 80 plantas (8 parcelas) y en uno se aislaron las flores de los polinizadores encerrándolas con una bolsa de tul, mientras que en el otro las flores quedaron expuestas. Se eligieron 32 plantas para hacerle un seguimiento más exhaustivo. En esas plantas se midió el número de flores por racimo, el número de flores visitadas por abejorros, el número de frutos, el peso de los tomates de las flores visitadas por abejorros. De cada parcela se eligieron dos plantas en las que se

registró el número de flores de cada racimo, el número de flores visitadas por abejorros y el número de flores que llegaron a dar frutos (cuajado).

El estudio se realizó considerando los racimos 2, 3, 4 y 5.

#### 6.2.4. Rendimiento de tomate

A medida que los frutos fueron alcanzando las características comerciales se fueron cosechando. Las cosechas se realizaron los días 3 y 23 de julio y 6 y 27 de agosto.

Los tomates obtenidos de las plantas pertenecientes a cada parcela fueron considerados en conjunto. En el laboratorio se separaron los frutos de acuerdo a sus características comerciales estableciendo tres categorías; categoría 1 (frutos con calidad comercial de mayor tamaño), categoría 2 (frutos con calidad comercial de menor tamaño) y descarte (frutos pequeños, defectuosos, con malformaciones o daños). Los tomates de cada categoría fueron contados y pesados.



Figura 40. Determinación del peso de los tomates por parcelas, previa categorización de los mismos por su tamaño.

Se seleccionaron los cuatro tomates con mejores características en cuanto a madurez y tamaño para determinar la textura y la concentración de azúcares (solo en dos tomates). La textura se midió con un penetrómetro (Poner UNIDAD DE MEDIDA) y la concentración de azúcares con un refractómetro (°Brix) (Figura 41).



Figura 41. Medición de la textura (izquierda) y la concentración de azúcares (derecha) en los tomates obtenidos de flores visitadas y no visitadas por abejorros.

Las plantas en las que se realizó el seguimiento de la floración fueron cosechadas de forma independiente. Al estar maduros los frutos se los cosecharon y posteriormente se cuantificó el peso, diámetro y número de semillas de cada uno (Figura 42).



Figura 42. Determinación del diámetro (izquierda) y el peso (derecha) de tomates obtenidos a partir de las plantas marcadas en cada tratamiento.

#### 6.2.5. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SAS (SAS®, 2002), utilizando como base el PROC GLM (Modelo Lineal General). El criterio para determinar si un efecto fue significativo fue la prueba F, se reportó el valor de p y se consideró significativo los efectos con p menor a 0,05 (Littell *et al.*, 2007).

### 6.3. RESULTADOS

#### 6.3.1. Actividad de los abejorros

Durante el período de estudio se percibió visualmente que las colonias de abejorros se iban despoblando (no se registró la población). El número de flores visitadas por los abejorros fue variando en los diferentes racimos que iban floreciendo a lo largo del periodo de estudio ( $F= 17,17$ ;  $P= 0,02$ ). Al comienzo de la floración (racimo 2) los abejorros visitaron el 43 % de las flores. En las flores correspondientes a los racimos 3 y 4 disminuye la proporción de flores visitadas para aumentar levemente en las flores del racimo 5 (Figura 43). Por otro lado, el número de flores disponibles correspondientes a los racimos 2 y 3 fue similar y luego disminuye en los dos racimos siguientes (Figura 43).

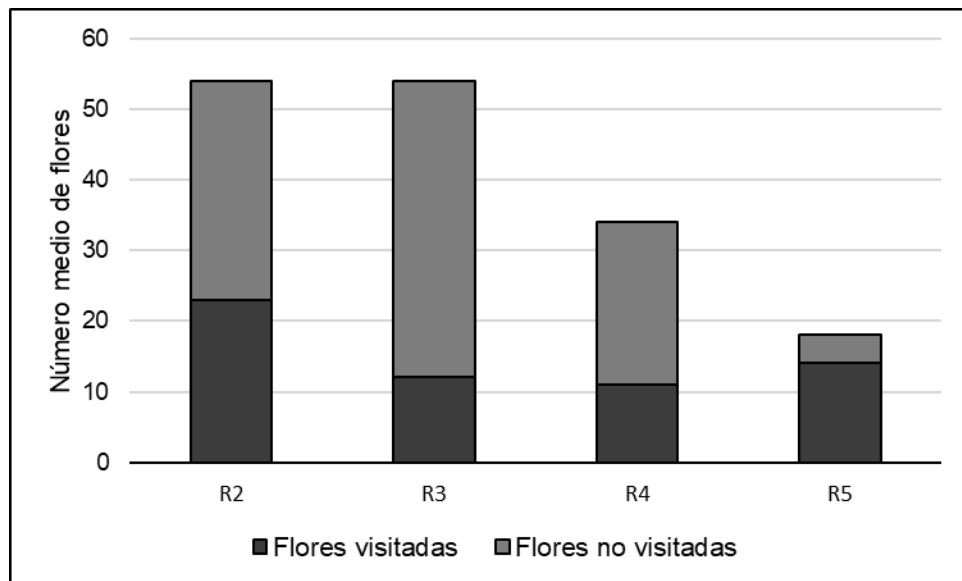
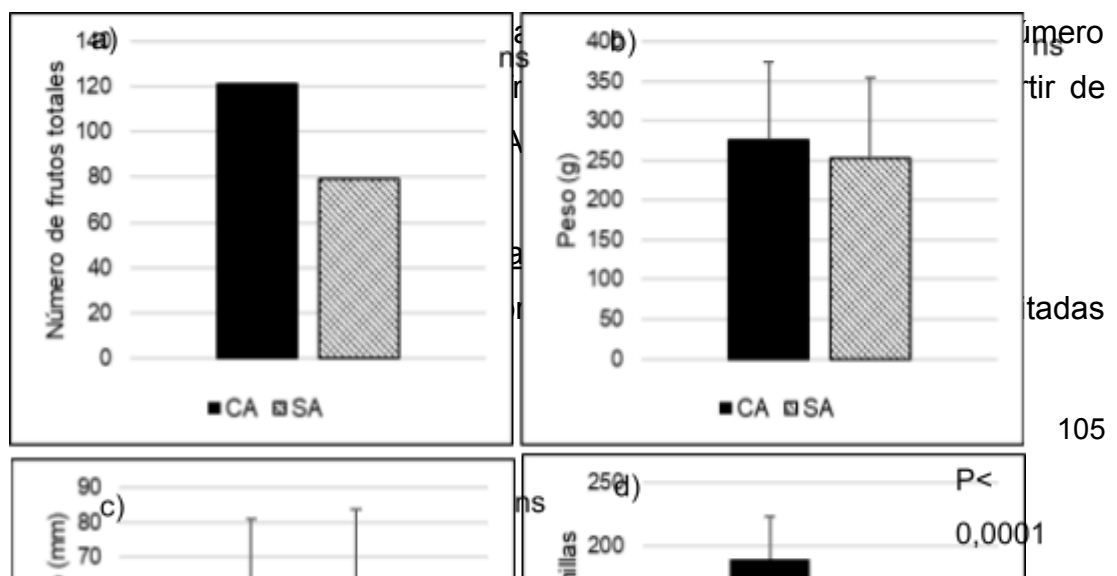


Figura 43. Número medio de flores visitadas y no visitadas correspondientes a los cuatro racimos estudiados.

### 6.3.2. Rendimiento de tomate por planta

Se realizó un Modelo Lineal General en el que analizaron las variables número de frutos, peso, diámetro y número de semillas.

Se encontraron diferencias entre las plantas que recibieron visitas de abejorros y las que no en el número de frutos ( $F= 53,47$ ;  $P= 0,01$ ) y en el número de semillas ( $F= 16,63$ ;  $P= 0,0001$ ). En cambio, los tomates obtenidos mediante la polinización de abejorros no difirieron en el peso ( $F= 2,66$ ;  $P= 0,10$ ) ni en el diámetro ( $F= 0,25$ ;  $P= 0,62$ ) con respecto a los que no fueron visitados por abejorros (Figura 44).



y no visitadas por abejorros fue similar,  $132,0 \pm 8,6$  y  $125,5 \pm 5,53$ , respectivamente ( $F=0,34$ ;  $P=0,57$ ). Al analizar los tomates de las categorías 1 y 2 tampoco se hallaron diferencias en la cantidad obtenida de cada tratamiento (Categoría 1:  $F=3,00$ ,  $P=0,10$ ; Categoría 2:  $F=2,79$ ,  $P=0,11$ ) (Figura 45).

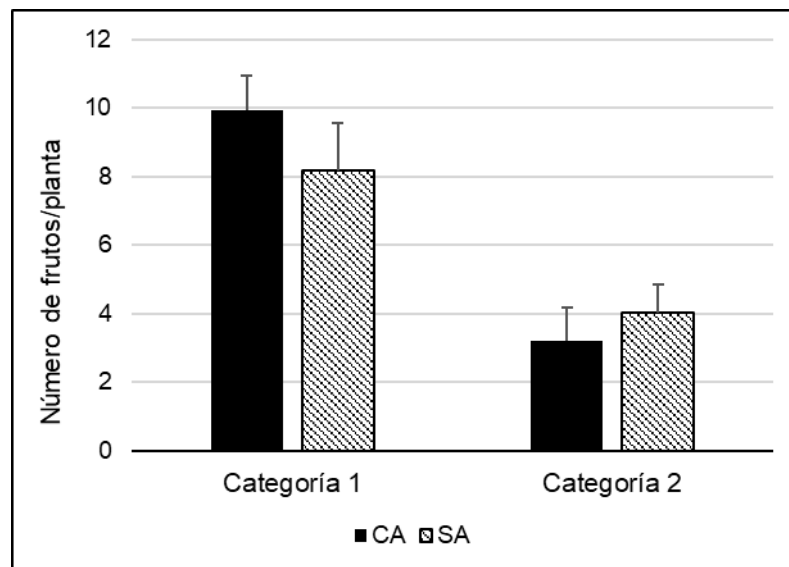


Figura 45. Número de tomates de categoría 1 y categoría 2 obtenidos de flores excluidas de los abejorros (SA) y visitadas por los abejorros (CA).

El rendimiento (peso) de tomates obtenidos de las flores visitadas y no visitadas por abejorros no mostró diferencias,  $3,59$  kg/planta y  $3,25$  kg/planta, respectivamente ( $F= 0,34$ ;  $P= 0,34$ ). Analizando separadamente los rendimientos de los tomates las categorías 1 y 2 tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas ( $F= 2,23$ ;  $P= 0,15$ ,  $F= 3,67$ ;  $P= 0,07$ , respectivamente), aunque en la categoría 2 el respaldo estadístico marginal evidencia una tendencia (Figura 46).

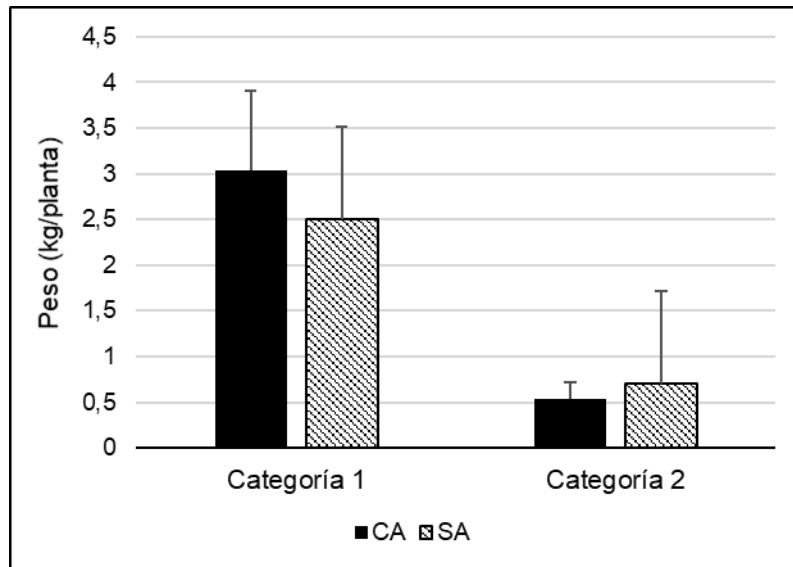


Figura 46. Peso de tomates de categoría 1 y categoría 2 obtenidos de flores excluidas de los abejorros (SA) y visitadas por los abejorros (CA).

#### 6.3.4. Textura y contenido de azúcares de los tomates

La textura considerando todos los tomates obtenidos de las flores visitadas y no visitadas por abejorros no mostró diferencias ( $F=0,50$ ;  $P=0,53$ ) (Figura 47). Sin embargo, al analizar la textura de los frutos obtenidos en diferentes cosechas se encontraron diferencias, siendo los tomates obtenidos de las primeras tres cosechas más firmes (0,99 N, 0,98 N y 0,98 N) que los obtenidos de flores no visitadas por abejorros (0,94 N) ( $F=16,18$ ;  $P=0,02$ ) (Cuadro 2).

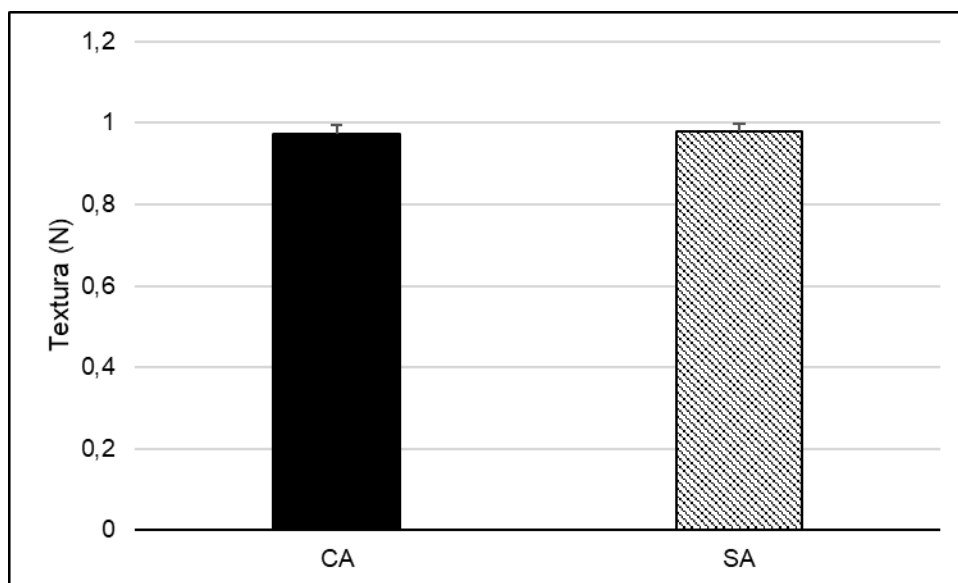


Figura 47. Textura (N) medida en los tomates obtenidos a partir de flores polinizadas con abejorros (CA) y sin polinizar. Los valores corresponden al número medio de frutos seleccionados de cada tratamiento.

Cuadro 2. Textura (N) de los frutos de tomates de plantas polinizadas por abejorros (CA) y sin polinizar (SA).

FECHAS	CA	SA
3 de julio	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01
23 de julio	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,01
6 de agosto	0,98 ± 0,01	0,99 ± 0,01
27 de agosto	0,95 ± 0,03	0,94 ± 0,02

La concentración de azúcares de todos los tomates obtenidos de las flores visitadas y no visitadas por abejorros fue promediamente de 4,20 ±0,43 y 4,11 ±0,52, respectivamente mostrando diferencias marginales (F= 6,18; P= 0,058) (Figura 48). Al analizar la concentración de azúcar de los frutos obtenidos en diferentes cosechas se encontraron diferencias (F= 138,72; P= 0,001). La mayor concentración de azúcar se obtuvo en los frutos de la primera cosecha (4,68 °Brix) (Cuadro 3).

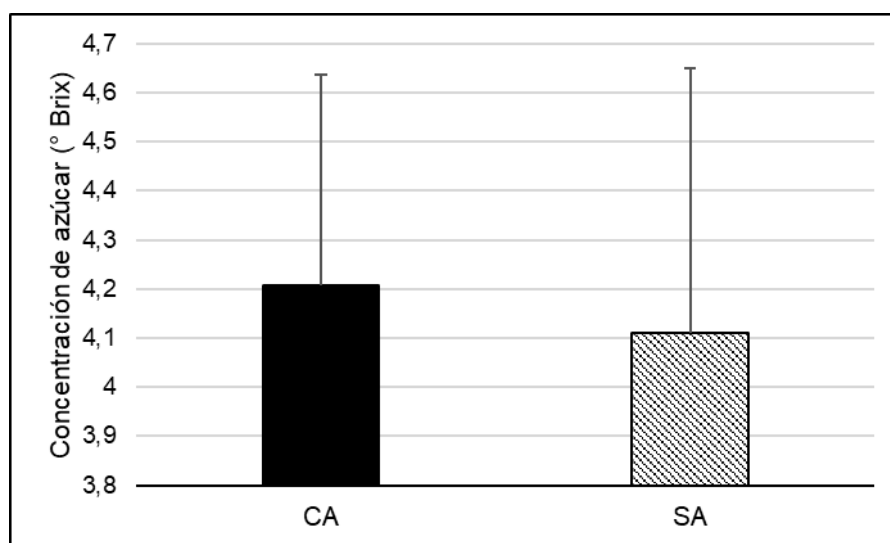


Figura 48. Concentración de azúcar (° Brix) medido en los tomates obtenidos a partir de flores polinizadas con abejorros (CA) y sin polinizar. Los valores corresponden al número medio de frutos seleccionados de cada tratamiento.

Cuadro 3. Concentración de azúcar (°Brix) de los frutos de tomates de plantas polinizadas por abejorros (CA) y sin polinizar con abejorros (SA).

	CA	SA
3 de julio	4,73 ± 0,29	4,62 ± 0,31
23 de julio	3,73 ± 0,15	3,52 ± 0,56
6 de agosto	4,08 ± 0,22	4,01 ± 0,37
27 de agosto	4,29 ± 0,28	4,24 ± 0,17

## 6.4. DISCUSIÓN

Este estudio aportó información sobre el efecto de los abejorros en variables del tomate de directa importancia económica como son el rendimiento total, el número de frutos y su calidad, y la textura y concentración de azúcares. Por otro lado, a diferencia del estudio del capítulo precedente, no se emplearon abejorros *B. atratus*, sino *B. bellicosus*, la otra especie nativa presente en Uruguay.

### 6.4.1. Actividad de los abejorros

La actividad de los abejorros tuvo un descenso pronunciado entre la floración del segundo y tercer racimo que obedeció a una merma de la población de las colonias. La rápida pérdida de población luego de instaladas las colonias obtenidas de trasiego de nidos naturales ya había sido observada por Salvarrey *et al.* (2017), tanto en *B. bellicosus* como en *B. atratus*. Esta tendencia al despoblamiento aparece más atenuada en las colonias de *B. atratus* obtenidas mediante cría artificial como se mostró en el capítulo 1. La diferencia entre las colonias trasegadas y las colonias artificiales puede radicar en que las primeras buena parte de los abejorros ya cuentan con experiencia de forrajeo, mientras que en las segundas los abejorros aún no han realizado actividades externas.

Los abejorros *B. bellicosus* utilizados no mostraron inconvenientes para visitar las flores de tomates, por lo que también pueden considerarse como una alternativa para polinizar los tomates en invernáculos. Esta especie es plausible de criar al igual que *B. atratus* (Salvarrey *et al.*, 2013), aunque no está siendo criada para el mercado. *Bombus bellicosus* presenta algunas diferencias morfológicas y comportamentales con *B. atratus* que podría darle ventajas en la polinización de algunos cultivos (Arbulo *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2015).

#### 6.4.2. Rendimiento de tomate por planta

Las plantas polinizadas por abejorros produjeron mayor número de tomates que las no polinizadas. Sin embargo, los abejorros no tuvieron incidencia en el peso y el tamaño de los tomates, discrepando con los resultados del capítulo anterior donde en dos de las tres experiencias realizadas la acción polinizadora de los abejorros mejoraron estas dos características.

Los abejorros si tuvieron una clara incidencia en el número de semillas de los frutos, resultado esperable porque la formación de semillas es consecuencia directa del proceso de polinización y depende directamente de la cantidad de granos de polen que son efectivamente removidos y que

llegan al estigma, por tanto es un fiel verificador de la eficiencia del polinizador (De Luca *et al.*, 2019; Messinger *et al.*, 2016; Torres-Ruíz y Jones, 2012). La mayor producción de semillas en tomates obtenidos de flores polinizadas por abejorros coinciden con los encontrados en el capítulo anterior y los reportados en numerosos estudios (Bashir *et al.*, 2019; Riaño *et al.*, 2015; Vaissière *et al.*, 2011; Wittman, 2009; Aldana *et al.*, 2007; Morandin *et al.*, 2001a; b). La presencia de semillas es importante ya que son una fuente de reguladores de crecimiento que juegan un rol muy relevante al momento del desarrollo del fruto y en sus propiedades fisicoquímicas (Miransari y Smith, 2014; Dazgan y Odogan, 2004).

#### 6.4.3. Rendimiento de tomate en las parcelas

En las parcelas no se encontraron diferencias en el rendimiento (peso) ni en el número de tomates entre plantas polinizadas y no por polinizadas por abejorros. Sin embargo, al diferenciar los tomates por categorías de acuerdo a características comerciales (especialmente tamaño), la proporción entre tomates de categoría 1 y categoría 2 fue mayor en las plantas polinizadas por abejorros. El efecto de los polinizadores en la calidad comercial de los tomates ha sido reportado en otros estudios (Bashir *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2015; Aldana *et al.*, 2007; Estay *et al.*, 2001; Morandin *et al.*, 2001b; Dogterom *et al.*, 1998; van Ravestijn y van der Sande, 1991)

Las plantas de tomates, de acuerdo a las características o condiciones en las que se desarrollen tienen determinada energía, la cual es configurada como la cantidad de asimilados disponibles (la cantidad de azúcares simples que le queda luego del proceso de respiración). Estos asimilados deben distribuirse entre el crecimiento de planta y los distintos órganos vegetales que demandan asimilados para su crecimiento. Esta repartición se ve afectada por el número de frutos que una planta presenta, determinando que a mayor cantidad de frutos menor sea la energía asignada a cada uno, y por ende, menor el tamaño que alcanzan (Dogliotti, 2011). En base a este principio, una práctica muy utilizada para beneficiar la producción de tomates

consiste en la eliminación de algunos frutos y estructuras vegetativas (raleo) de modo de potenciar los frutos que ya se encuentran en crecimiento (Dogliotti, 2011). Esto explicaría porque en las parcelas no hubo diferencias en el número de frutos entre plantas polinizadas y no polinizadas, pero si se encontraron diferencias en la categoría (peso y tamaño), mostrando que la polinización eficiente resulta en frutos de mejor calidad (Bashir *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2015; Aldana *et al.*, 2007; Estay *et al.*, 2001; Morandin *et al.*, 2001b; Dogterom *et al.*, 1998; van Ravestijn y van der Sande, 1991).

#### 6.4.4. Textura y contenido de azúcares de los tomates

El sabor y la calidad de frutos de tomate están asociados a diferentes cualidades entre las que se destacan la textura y la concentración de azúcares (Monge y Loría 2019; Salunkhe *et al.*, 1974). En este estudio la textura no fue una característica que en términos generales se viera afectada por la acción polinizadora de los abejorros, aunque se encontraron diferencias en la última cosecha donde los tomates presentaron menor firmeza. La textura depende de la madurez del fruto, y en este sentido se ha observado que frutos cosechados aún con color verde difieren en firmeza con respecto a los tomates más rojos o “pintones” (Salunkhe *et al.*, 1974). En este trabajo no se estableció un criterio estricto en cuanto al momento de cosecha de los frutos, por lo que pudo haber incidido en que haya habido una diferencia en un solo registró. Además, en la última cosecha se observó un incremento de frutos con podredumbres y hongos en la superficie que pudo haber afectado la textura (Amaya *et al.*, 2010).

Respecto a la concentración de azúcar se evidenció una tendencia a favor de los tomates de plantas polinizadas por los abejorros frente a los tomates de plantas no polinizadas. Los tomates obtenidos en la primera cosecha son los que presentaron mayor concentración de azúcares (4,6 °Brix). Justamente las flores que dieron lugar a estos tomates fueron las que recibieron mayor cantidad de visitas de los abejorros. Una eficiente polinización se relaciona con una mayor concentración de azúcares (Bashir

*et al.*, 2019). Por otro lado, se ha reportado que tomates que presentan valores superiores a 4,5 °Brix se catalogan como de buen sabor, mientras que los que tienen menos de 4,0°Brix se consideran de baja calidad (Bashir *et al.*, 2019; Castellanos, 2009). Así, la fuerte presencia de abejorros visitando las flores del segundo racimo dio lugar a frutos de mayor calidad.

#### 6.4.5. Consideraciones finales

En la producción de tomates el rendimiento depende de diversos factores como la variedad, el número y peso de los frutos, el ciclo del cultivo, el genotipo, las condiciones ambientales, la presencia de plagas y enfermedades, la densidad de siembra, y las podas (Bashir *et al.*, 2019). En este marco, el estudio realizado muestra que el uso de abejorros nativos como polinizadores es un instrumento que puede aportar a mejorar indicadores como tamaño y peso (mejor categoría de tomate con criterios comerciales), así como la concentración de azúcares.

De todos modos, los resultados obtenidos en este estudio no son contundentes y se requiere seguir profundizando en el tema para afinar el uso de esta nueva biotecnología. Por lo pronto, el tamaño y durabilidad de las colonias de abejorros aparece como un factor crucial para poder polinizar eficientemente todos los racimos de las plantas de tomate y diluir los costos de la compra de colmenas.

## 7. CAPÍTULO 4. IDENTIFICACION DE LOS PATÓGENOS INTERNOS, EXTERNOS Y VIRUS EN ABEJORROS *B. ATRATUS*

### 7.1. INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de abejorros del género *Bombus*, al igual que la de las abejas melíferas *Apis mellifera* y de otros ápidos polinizadores, están siendo amenazadas en muchas regiones del mundo por diferentes factores, lo que podría tener consecuencias negativas en la producción agrícola y el mantenimiento de los ecosistemas naturales (Chaplin-Kramer *et al.*, 2019; Potts *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2007; Goulson, 2003). Entre estas amenazas se destacan diferentes grupos de parásitos, patógenos y virus, algunos específicos del género *Bombus* y otros compartidos con otros grupos de insectos (Manley *et al.*, 2015; Daszak *et al.*, 2000). El extenso comercio y movimiento de abejas melíferas, y en menor medida algunas especies de *Bombus* (ej. *Bombus terrestris*), ha provocado la dispersión de patógenos a nuevas regiones donde anteriormente no se encontraban, fenómeno conocido como “derrame de patógenos” (*spillover*) (Hicks *et al.*, 2018; Evans, 2017; Graystock *et al.*, 2015; Daszak *et al.*, 2000).

Uno de los ejemplos más claros de *spillover* es el del microsporidio *Nosema ceranae*, que se encuentra presente en abejas melíferas (Higes *et al.*, 2010), abejorros (Plischuk y Lange, 2016; Arbulo *et al.*, 2015; Graystock *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012; Sokolova *et al.*, 2010), abejas sin aguijón (Porrini *et al.*, 2017; Freitas 2009,) en abejas solitarias (Euglossini) (Nemésio, 2009) y en avispa social (Porrini *et al.*, 2017). Otro ejemplo son los virus ARN más conocidos de las abejas melíferas, Acute bee paralysis virus (ABPV), Black queen cell virus (BQCV), Deformed wing virus (DWV) y Sacbrood virus (SBV), que también se encuentran en abejorros (Alger *et al.*, 2019; Bravi *et al.*, 2019; Evans, 2017; Gamboa *et al.*, 2015), en abejas sin aguijón (Alvarez *et al.*, 2018; Ueira-Viera *et al.*, 2015), en algunas especies silvestres solitarias como *Xylocopa augusti* (en la que se detectó DWV) (Lucia *et al.*,

2014) y en otros insectos polinizadores como sírfidos (Diptera) (Bailes *et al.*, 2018) y mariposas del orden Lepidoptera (Levitt *et al.*, 2013).

El abejorro *Bombus atratus*, ampliamente distribuido en Sudamérica (Abrahamovich *et al.*, 2004; Abrahamovich *et al.*, 2001), ha sido utilizado con éxito en la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*) en invernáculo (Aldana *et al.*, 2007; Salvarrey *et al.*, 2019), el pimentón (*Capsicum annum*) en invernáculo (Riaño *et al.*, 2015) y en la producción de semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) (Salvarrey *et al.*, 2017). Desde hace unos años las colonias de *B. atratus* se crían en cautiverio a pequeña escala en Colombia y Uruguay (Salvarrey *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2008) y a escala comercial en Argentina (Gennari, 2012), siguiendo una práctica muy extendida de cría de algunas especies europeas y norteamericanas (Velthuis y van Doorn, 2006; Velthuis, 2002). Desde el punto de vista sanitario, las condiciones de cría artificial (alta densidad de individuos, imposibilidad de salir al exterior a forrajear y abundante alimento), pueden incrementar la sobrevivencia y reproducción de diferentes patógenos, facilitando la proliferación y transmisión de enfermedades (Graystock *et al.*, 2013a; Murray *et al.*, 2013).

En Uruguay *B. atratus* se encuentra distribuido en todo el territorio, y junto con *Bombus bellicosus*, de distribución más restringida, son las dos únicas especies autóctonas del país (Santos *et al.*, 2017). Recientemente se estudió la presencia de parásitos internos y externos en reinas, obreras y machos de ambas especies en Uruguay (Revainera *et al.*, 2019; Plischuk *et al.*, 2016). En *B. atratus* la lista de parásitos internos incluyen a los microsporidios *N. ceranae* y *Tubilonosema pampeana*, el nematodo *Sphaerularia bombi* y una especie de díptero parasitoide (Plischuk *et al.*, 2016). Respecto a los ácaros externos se encontraron *Kuzinia* spp., *Pneumolaelaps longanalis*, *Pneumolaelaps longipilus*, *Scutacarus acarorum* y *Tyrophagus putrescentiae* (Revainera *et al.*, 2019).

La región más austral de Sudamérica (Argentina y Chile) se encuentra desde hace unos años especialmente amenazada por la dispersión de las especies exóticas, *Bombus terrestris* y *Bombus ruderatus*, introducidas en

Chile (Aizen *et al.*, 2018; Morales *et al.*, 2013). Por lo pronto, estas especies pudieron haber oficiado de reservorios de patógenos que saltaron a especies nativas ocasionando importantes daños en poblaciones naturales como es el caso de *Bombus dahlbomii*, especie nativa de la zona andina de Chile y norte de Argentina que se encuentra en peligro de extinción (Schmid-Hempel *et al.*, 2014; Arbetman *et al.*, 2012). Uruguay, país que limita con Argentina, no se encuentra libre de recibir a *B. terrestris* y *B. ruderatus*, o nuevos patógenos presentes en estas especies y dispersados por otras.

El objetivo de este estudio fue relevar de forma exhaustiva los parásitos externos, internos y virus ARN presentes en reinas, obreras colectadas en el campo y obreras de colonias obtenidas mediante cría artificial de *B. atratus*.

## 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1. Colecta de abejorros

En la primavera de 2014, se colectaron en el predio de la Facultad de Agronomía de Montevideo (34° 50' S, 56° 13' W) 33 reinas de *B. atratus* salidas de la hibernación. Diecinueve reinas fueron destinadas al análisis de parásitos y 14 al análisis de virus. A fines de la primavera de 2014 se extrajeron 92 abejorros de colonias obtenidas artificialmente a partir de reinas capturadas en el predio de la Facultad de Agronomía durante la misma estación siguiendo el protocolo de Salvarrey *et al.* (2013) y mantenidas en el laboratorio con 20-50 obreras. Cuarenta y seis obreras se destinaron al análisis de parásitos y 46 al análisis de virus. En febrero de 2015 se colectaron 54 obreras en el campo en el predio de la Facultad de Agronomía. Treinta y siete abejorros se destinaron al análisis de parásitos y 17 al análisis de virus. Los ejemplares asignados al análisis de parásitos se conservaron a - 20 °C, y los asignados al análisis de virus se conservaron a - 80°C.



Figura 49. Cría de abejorros *B. atratus* en el laboratorio de la Facultad de Ciencias.

#### 7.2.2. Identificación de parásitos internos y ácaros

Para la identificación de los parásitos internos se disecaron los abejorros bajo un microscopio estereoscópico (10x y 40x). Primeramente, se observó detenidamente la cavidad metasomal en busca de nemátodos o dípteros parasitoides en estado juvenil y luego las tráqueas en busca de ácaros (Plischuk *et al.*, 2016). Posteriormente se tomaron pequeñas muestras de tejido graso, túbulos de Malpighi, estómago e intestino, y se las observó con microscopio (400x y 1000x) para la detección de microsporidios y protistas (Solter *et al.*, 2012).

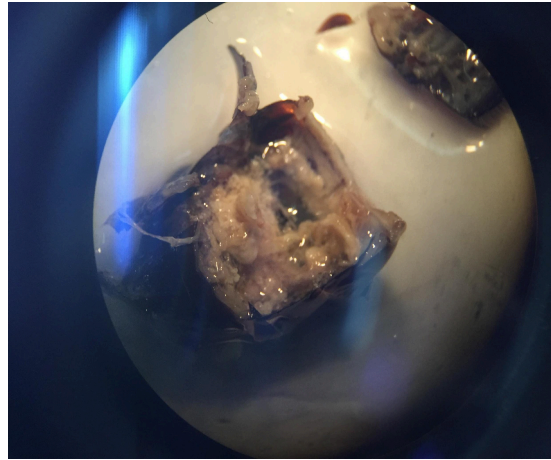


Figura 50. Disección de una obrera de *Bombus atratus*.

Se puso especial atención al tejido graso ya que la presencia anormal de gránulos en este tejido es indicativo del microsporidio *T. pampeana* (Plischuk *et al.*, 2015). Finalmente se homogenizó el cuerpo completo de los insectos infectados en 2 ml de agua destilada y se cuantificó el número de esporas usando una cámara de Neubauer (Undeen y Vávra, 1997).

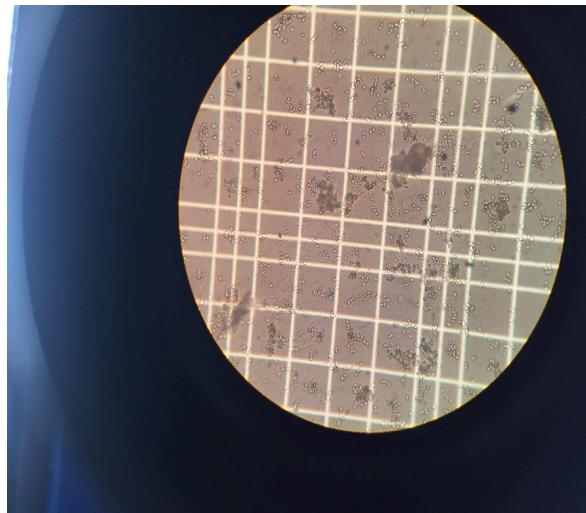


Figura 51. Conteo de esporas de microsporidios empleando una cámara de Neubauer.

Para identificar los ácaros foréticos se observaron los abejorros con una lupa óptica (4x), y en caso de ser necesario los ácaros fueron separados y observados al microscopio (40X). Se emplearon las claves acarológicas de Krantz y Walter (2009), Hunter (1966), Hunter y Husband (1973) y Putatunda *et al.* (1983). Para cada especie de ácaro se determinó en los tres grupos de abejorros el valor de prevalencia (porcentaje de abejorros con ácaros), abundancia (número de ácaros por abejorro inspeccionado) e intensidad (número de ácaros por abejorro parasitado). También se calculó para cada grupo de abejorros la diversidad de ácaros mediante el índice de Simpson. Además, teniendo en cuenta el valor del Índice de Simpsons e determinó la proporción de abejorros de cada grupo que presentaban diversidad Baja, Moderada y Alta siguiendo el criterio de Revainera *et al.* (2019): Baja diversidad (0-0,3), Moderada diversidad (0,3-0,6) y Alta diversidad (0,6-1).

### 7.2.3. Análisis de virus ARN

#### 7.2.3.1. Extracción de ARN y RT - qPCR

A las muestras de obreras y reinas de abejorros se les agregó 500 µl y 1200 µl de PBS, respectivamente. Posteriormente fueron homogeneizadas por medio de una varilla de vidrio estéril. La purificación del ARN viral se realizó utilizando el kit comercial PureLink™Viral RNA/DNA MiniKit (Invitrogen, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente se realizó la retrotranscripción a ADNc utilizando el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, EEUU).

La detección de virus se realizó utilizando el kit comercial Power SYBR<sup>R</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EEUU) y *primers* específicos tanto para los genes de referencia cómo para los virus (Tabla 3). La mezcla para una reacción consistió en 10 µl de Sybr, 0,6 µM de cada *primer* del par, 4,76 µl agua libre de RNAsas y 5 µl de ADNc. En todas las corridas se incluyeron controles negativos y se utilizaron diluciones seriadas

de una mezcla de todas las muestras para realizar la curva de calibración de los virus y de los genes de referencia.

Las reacciones de PCR en Tiempo Real se realizaron en un termociclador Bio-Rad CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, USA). El programa de ciclado consistió en una activación inicial a 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 10 min, y 39 ciclos de 95 °C durante 15 seg, 50 °C durante 30 seg y 60 °C durante 30 seg. La especificidad de la reacción se verificó mediante la inclusión de una curva de desnaturalización o *melting* de los productos amplificados (de 65 a 95 °C).

La media geométrica de los dos genes de referencia (RPS5 y  $\beta$ -actina) se utilizó para normalizar y estimar la expresión de los virus (Pfaffl, 2001).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la cuantificación de virus en las muestras mediante qPCR.

Cebador	Secuencia 5' – 3'	Virus/Gen	Referencia
ABPV1	ACCGACAAAGGGTATGATGC	ABPV	Johnson <i>et al.</i> , 2009
ABPV2	CTTGAGTTTGCGGTGTTCT		
DWV_F	CTGTATGTGGTGTGCCTGGT	DWV	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
DWV_R	TTCAAACAATCCGTGAATATAGTGT		
BQCV_F	AAGGGTGTGGATTCGTCAG	BQCV	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
BQCV_R	GCGTACCGATAAAGATGGA		
SBV_F	GGGTCGAGTGGTACTGGAAA	SBV	Johnson <i>et al.</i> , 2009
SBV_R	ACACAACACTCGTGGGTGAC		
BACTIN1	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	$\beta$ -actina	Yang y Cox-Foster, 2005
BACTIN2	GACCCACCAATCCATACGGA		

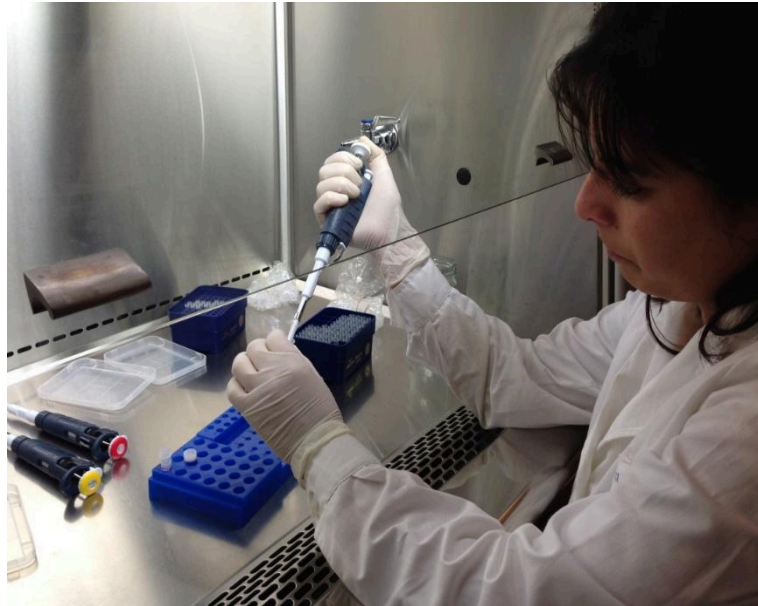


Figura 52. Análisis molecular de las muestras de abejorros de *B. atratus*.

#### 7.2.4. Análisis de datos

La prevalencia de los diferentes grupos de patógenos, ácaros y virus en las reinas, obreras colectadas en el campo y obreras de colonias criadas en laboratorio se comparó mediante una prueba de Chi cuadrado. El nivel de infección por microsporidios así como el número de ácaros en los abejorros de los tres grupos mencionados se comparó empleando el test de Kruskal Wallis. En todos los casos valores de P menores a 0,05 fueron considerados significativos.

### 7.3. RESULTADOS

Durante el análisis de los abejorros se identificaron los microsporidios *N. ceranae* y *T. pampeana*, un díptero de la familia Copidae, el nematodo *Sphaerularia bombi* y los ácaros foréticos *Tyrophagus putrescentinae*, *Pneumolaelaps longanalis*, *Pneumolaelaps longipilus*, *Kuzinia* spp y *Parasitellus fucorum* y los virus BQCV, ABPV, SBV y DWV.

#### 7.3.1. Patógenos internos

*Nosema ceranae* y *T. pampeana* fueron los microsporidios encontrados en los tres grupos de individuos de *B. atratus* analizados. La prevalencia de *N. ceranae* en el total de muestras fue de 26,5%. Se encontraron diferencias en la prevalencia entre grupos ( $\chi^2= 14,72$ ;  $P= 0,0006$ ), siendo mayor en las obreras capturadas en el campo (45,9%) que en las obreras obtenidas en el laboratorio (13,0%) ( $\chi^2= 12,6$ ;  $P= 0,0004$ ) y las reinas (16,6%) ( $\chi^2= 5,78$ ;  $P= 0,016$ ). Los ejemplares de los dos últimos grupos no mostraron diferencias ( $\chi^2= 0,08$ ;  $P= 0,77$ ).

En cuanto al nivel de infección las reinas presentaron  $2,1 \pm 2,9 \times 10^6$  esporas/individuo, las obreras de campo  $2,4 \pm 0,96 \times 10^5$  esporas/individuo y las de laboratorio  $3,4 \pm 4,8 \times 10^5$  esporas/individuo, sin que se encontraran diferencias entre grupos (Kruskal-Wallis test,  $H= 1,58$ ;  $P= 0,45$ ).

El 13,7 % de los abejorros estaban infectados con *T. pampeana*. No se encontraron diferencias significativas en la prevalencia entre los grupos analizados ( $\chi^2= 1,93$ ;  $P= 0,38$ ); en las obreras capturadas en el campo (8,1 %), en las obreras obtenidas en el laboratorio (15,2 %) y en las reinas (21,0 %). En cuanto al nivel de infección las reinas presentaron  $6,4 \pm 2,5 \times 10^5$  esporas/individuo, las obreras de campo  $5,2 \pm 8,0 \times 10^5$  esporas/individuo y las obreras de laboratorio  $2,4 \pm 3,5 \times 10^5$  esporas/individuo, sin que se encontraran diferencias entre grupos (Kruskal-Wallis test,  $H= 2,86$ ;  $P= 0,23$ ).

Se encontraron tres casos (2,9 %) de coinfección con los dos tipos de microsporidios, los que correspondieron a dos muestras de obreras de campo y una reina.

### 7.3.2. Parásitos

Por otro lado, se constató la presencia de otro parasito del tipo Nematode, específicamente la especie *Sphaerularia bombi*, el cual apareció solamente en dos reinas con dos adultos en un ejemplar y 7 adultos en el otro.

### 7.3.3. Parasitoides

Se encontraron larvas de dípteros del género Conipidae en obreras de campo (16,2 %) y en reinas (10,5 %) ( $\chi^2 = 7,69$ ;  $P < 0,05$ ). Este parásito no se encontró en obreras de nidos obtenidos en laboratorio.

#### 7.3.4. Ácaros foréticos

Se encontraron cuatro géneros diferentes de ácaros foréticos, entre los cuales se lograron identificar cinco especies: *Tyrophagus putrescentinae*, *Pneumolaelaps longanalis*, *Pneumolaelaps longipilus*, *Parasitellus fucorum* y *Kuzinia* spp.

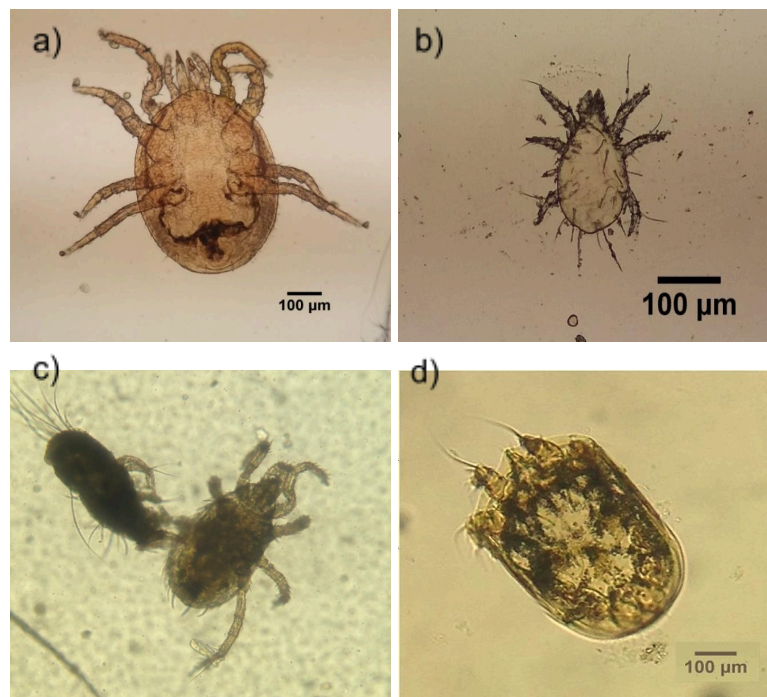


Figura 53. Diferentes especies de ácaros foréticos encontrados sobre los abejorros *Bombus atratus*. a) *Pneumolaelaps longanalis*, b) *Tyrophagus putrescentinae*, c) *Pneumolaelaps longipilus*, d) *Kuzinia* spp.

El 57,8 % de los abejorros analizados presentaba por lo menos un tipo de ácaro. El grupo con mayor prevalencia de ácaros fueron las reinas (73,6 %), seguidos por las obreras de laboratorio (65,2 %) y las obreras de campo (40,5 %) ( $\chi^2 = 7,52$ ;  $P < 0,05$ ). Los ácaros más abundantes fueron *T. putrescentinae* predominando en las obreras de laboratorio (Kruskal-Wallis

test,  $H= 21,56$ ;  $P< 0,0001$ ) y *Kuzinia* spp. en las obreras de campo (Kruskal-Wallis test,  $H= 15,36$ ;  $P< 0,0001$ ).

Tabla 4. Prevalencia (P), Abundancia (A) e Intensidad (I) de ácaros observados sobre los abejorros *B. atratus* por grupo (obreras de laboratorio, obreras de campo y reinas). Prevalencia es el porcentaje de abejorros con ácaros, abundancia es el número de ácaros por abejorro inspeccionado e intensidad es el número de ácaros por abejorro infectado.

<i>B. atratus</i>		<i>T. putrescentiae</i>	<i>P. longanalis</i>	<i>P. longipilus</i>	<i>Kuzinia</i> sp	<i>P. fucorum</i>
Obreras de laboratorio	P	58,7	-	8,7	13,0	-
	A	4,0	-	0,0	0,2	-
	I	6,7	-	1,0	1,3	-
Obreras de campo	P	10,8	2,7	2,7	29,7	2,7
	A	0,2	0,1	0,0	3,6	0,0
	I	1,8	4,0	1,0	1,3	1,0
Reinas	P	63,2	31,6	26,3	21,1	-
	A	26,5	2,7	0,3	0,3	-
	I	42,0	8,7	1,2	1,3	-
Total	P	42,2	6,9	9,8	20,6	1,0
	A	6,8	0,5	0,1	1,4	0,0
	I	16,1	8,0	1,1	7,0	1,0

El índice de diversidad de Simpson fue de 0,08 para las obreras de laboratorio, 0,12 para las obreras de campo y 0,18 para las reinas. La clasificación de los abejorros siguiendo el criterio de Revainera *et al.* (2019) mostró que prácticamente todos tenían baja diversidad (Figura 54).

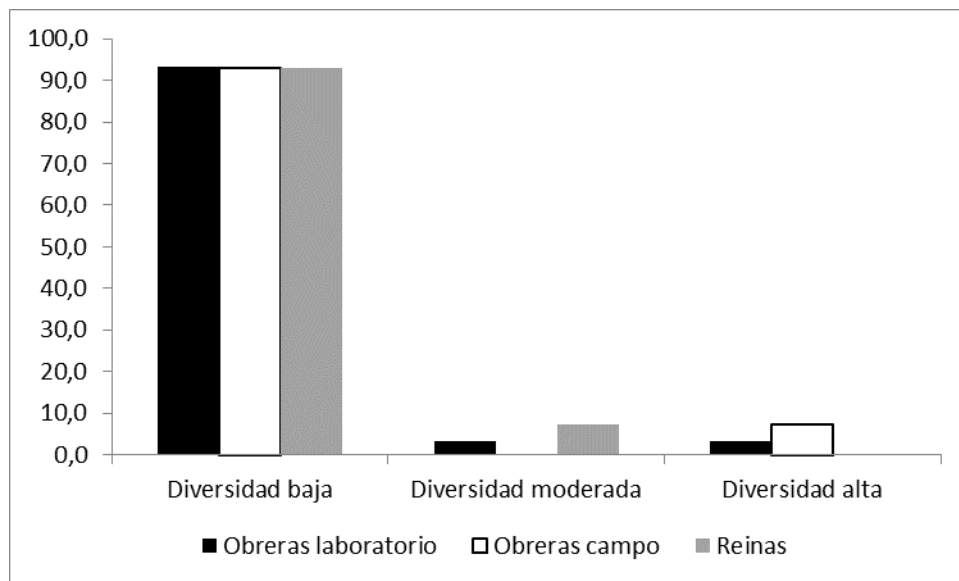


Figura 54. Proporción de obreras de laboratorio, obreras de campo y reinas que presentaban diversidad baja, moderada y alta de acuerdo al criterio de Revainera *et al.* (2019): Baja (0-0,3), Moderada (0,3-0,6) y Alta (0,6-1).

El grupo que presentó mayor diversidad de especies fueron las reinas ( $\chi^2 = 12,89$ ;  $P < 0,05$ ), en las que se encontró que el 64,3% presentaron más de una especie, pudiendo tener dos, tres o incluso hasta cuatro tipos de ácaros diferentes por individuo. Esta “coinfeción” no se pudo observar en las obreras extraídas del campo ni en las obreras obtenidas en la cría del laboratorio donde sólo el 13,3 % y el 16,6 %, respectivamente, presentaron más de una especie de ácaros. En las obreras obtenidas en el laboratorio llama la atención la poca diversidad de especies de ácaros debido a la prevalencia que poseía dicho grupo (65,2 %).

### 7.3.5. Virus ARN

En el 82,4% de los abejorros analizados se detectó por lo menos un virus ARN de los buscados (BQCV, SBV, DWV y ABPV), siendo el BQCV el más prevalente apareciendo en un 80,9 % de las muestras, con una amplia diferencia con respecto a los demás (Tabla 2). En cuanto a la detección de los diferentes virus entre los grupos analizados, se encontraron diferencias

para el DWV y para SBV, siendo éste más prevalente en las obreras de campo.



Figura 54. Obrera de abejerro con alas deformadas, claro síntoma del Virus de las alas deformes (DWV).

Tabla 5. Prevalencia de virus detectados en los tres grupos de abejorros analizados. Letras diferentes entre los grupos de abejorros significan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la proporción de abejorros infectados para el test de Chi cuadrado.

<i>Grupos</i>	<i>BQCV</i>	<i>DWV</i>	<i>ABPV</i>	<i>SBV</i>
<i>Obreras de campo</i>	93,8 <sup>a</sup>	37,5 <sup>a</sup>	18,8 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>
<i>Reinas</i>	66,7 <sup>a</sup>	16,7 <sup>ab</sup>	33,3 <sup>a</sup>	25,0 <sup>b</sup>
<i>Obreras de laboratorio</i>	80,0 <sup>a</sup>	7,5 <sup>b</sup>	12,5 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>
<i>Total</i>	80,9	5,9	17,6	17,6

El 51,5 % del total de abejorros analizados presentó un solo virus, entre estos la gran mayoría correspondió a BQCV, en un solo caso se constató la presencia de ABPV de forma aislada en una reina. En los casos de coinfección (30,9 %) las combinaciones fueron variadas. Cuando aparecieron ejemplares con dos virus predominó la presencia de BQCV-ABPV (N= 8), seguido por BQCV-SBV (N= 5). La detección de tres tipos de virus diferentes en un mismo individuo se constató

predominantemente en las obreras de campo (N= 4), encontrándose en los demás grupos (obreras de laboratorio y reinas) un solo caso.

#### 7.4. DISCUSIÓN

Con el decaimiento de las poblaciones de polinizadores y el manejo de abejas melíferas y abejorros como herramienta biotecnológica para mejorar la producción agrícola, muchos estudios se han enfocado la transmisión de enfermedades como forma de entender la dinámica de diferentes patógenos y los efectos ecológicos que pueden tener (Chaplin-Kramer *et al.*, 2019; Wojcik *et al.*, 2018; Fürst *et al.*, 2014; Graystock *et al.*, 2014; Potts *et al.*, 2014; Goulson, 2008).

Las colonias de abejorros son de ciclo anual, y solo las reinas sobreviven en invierno. Esta característica ha moldeado el comportamiento de los parásitos y patógenos para reproducirse y propagarse superando el periodo en que las colonias desaparecen (Goulson, 2003; Huck *et al.*, 1998; Binns, 1982).

En este estudio se relevaron los principales parásitos internos y externos, así como virus ARN de reinas, obreras capturadas en el campo y obreras obtenidas de cría artificial de *B. atratus*, permitiendo analizar el efecto de la casta y las condiciones de cría en la prevalencia de diferentes parasitosis y virosis.

##### 7.4.1. Patógenos internos

Los microsporidios *N. ceranae* y *T. pampeana* fueron encontrados en los tres grupos de abejorros. En Uruguay ambas especies de microsporidios, ya habían sido reportados para *B. atratus* en Uruguay; *N. ceranae* fue hallada en abejorros locales por Arbulo *et al.* (2015) y posteriormente, se le sumó la detección de *T. pampeana* (Plischuk *et al.*, 2016). *Nosema ceranae* se encontró en mayor prevalencia en las obreras de campo (45,9 %), un valor mayor al encontrado por Plischuk *et al.* (2016) (28,6 %), pero menor al encontrado por Arbulo *et al.* (2015) (72 %).

Pese a que en las reinas la prevalencia de la nosemosis fue un tercio de las de las obreras de campo, la carga de esporas ( $2,1 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^6$ ) fue aproximadamente 10 veces mayor que la que presentó los dos grupos de obreras. La falta de respaldo estadístico en el nivel de infección entre los tres grupos obedece seguramente al bajo número de individuos infectados (solo dos reinas). Estos resultados no concuerdan con los encontrados por Plischuk *et al.* (2016) en abejorros *B. atratus* en Uruguay, donde las obreras estaban más infectadas que las reinas ( $1,2 \times 10^7$  y  $6,5 \times 10^6$ , respectivamente). Las diferencias en prevalencia y nivel de infección encontrados entre los diferentes estudios puede deberse a la región y al momento del año en que se colectan los abejorros.

En abejas melíferas, la prevalencia de *N. ceranae* depende de la región y el momento del año (Anido *et al.*, 2015; Antúnez *et al.*, 2015). En Uruguay se ha encontrado que en dicha especie la disponibilidad de polen de diverso origen botánico contribuye a disminuir los niveles de infección por *N. ceranae* (Branchiccela *et al.*, 2019; Invernizzi *et al.*, 2011). Si bien este tema ha sido poco estudiado en abejorros, Rotheray *et al.* (2017) encontró en un estudio con *B. terrestris*, que hay una relación negativa entre el grado de infección con *N. ceranae* y la cantidad de alimento (polen y jarabe de azúcar) que se les brindó a las colonias. En este sentido, *N. ceranae* cuyo huésped natural es la abeja asiática *Apis cerana* (Fries, 2010), se encuentra infectando muchas especies de abejorros en todo el mundo y podría impactar negativamente en sus poblaciones (Alger *et al.*, 2019; Hicks *et al.*, 2018; Graystock *et al.*, 2015; Colla *et al.*, 2006).

*Tubilonosema pampeana* es un microsporidio descrito hace pocos años en *B. atratus* en Argentina (Plischuk *et al.*, 2015). La prevalencia de este parásito en reinas, obreras de campo y obreras de laboratorio fue baja, concordando con lo hallado por Plischuk *et al.* (2015) para Argentina (5,3 %). Sin embargo, en Uruguay Plischuk *et al.* (2016) hallaron *T. pampeana* en el 36,2 % de las reinas y solo en el 1,8 % de las obreras de *B. atratus*. Llamativamente, tanto en Argentina como en Uruguay *T. pampeana* solo se

registró concentrada en algunas zonas (Plischuk *et al.*, 2015; 2016). El impacto que puede tener este nuevo microsporidio a nivel individual y colonial es aún desconocido. Plischuk *et al.* (2015) lo encontró infectando el tejido adiposo, los túbulos de Malpighi, las células musculares, el tejido neural, el tracto digestivo y el tejido conectivo, por lo que a nivel individual cabría esperar efectos relevantes.

#### 7.4.2. Párasitos

El nemátodo *S. bombi* solo fue hallado en las reinas con baja prevalencia (10,5%). Esta prevalencia es similar a la hallada por Plischuk y Lange (2012) en reinas de *B. atratus* en Argentina (8 a 20 %), pero bastante menor a la hallada por Plischuk *et al.* (2016) en reinas de la misma especie en Uruguay (40 %). Al igual que con los microsporidios, la proporción de reinas afectadas debe estar sujeta al sitio y momento de colecta, y especialmente a las condiciones de hibernación. *Sphaerularia bombi* es un parásito ampliamente distribuido en el mundo, que ha sido hallado en aproximadamente 30 especies de abejorros. En las reinas puede causar castración y hacer que vuelen sobre el suelo y por menos tiempo (Jones y Brown, 2014; Goulson, 2010; 2003; Poinar y van der Laan, 1972), Este nematodo tiene gran incidencia en el éxito de cría en cautiverio, ya que al estar presente en una reina no permite que ésta desarrolle el nido (Plischuk y Lange, 2012).

#### 7.4.3. Parasitoides

Se encontraron larvas de dípteros del género Conopidae únicamente en las obreras de campo (16,2 %) y en las reinas (10,5 %). Estas prevalencias son superiores a las encontradas por Plischuk *et al.* (2016), seguramente debido a que en este estudio se analizó un número de muestras más pequeño. Este parasitoide tiene una amplia dispersión y ha mostrado gran asociación con los abejorros. Su presencia puede

desencadenar respuestas anormales en el abejorro: cambian su patrón alimenticio, están más tiempo fuera del nido y presentan comportamiento de enterramiento en las fases últimas de parasitoidismo (Müller, 1994; Müller y Schmid-Hempel, 1993).

#### 7.4.4. Ácaros foréticos

El efecto de los ácaros en las poblaciones de abejorros no es claro desde el momento en que no se alimentan de sus hospederos. Muchos grupos se alimentan de ceras y polen y otros de pequeños nematodos y hongos por lo que podrían ser beneficiosos para los abejorros (Revainera *et al.*, 2014; Rozèj *et al.*, 2012; Maggi *et al.*, 2011). Sin embargo, los ácaros pueden actuar como agentes de infección facilitando la introducción de hongos y demás patógenos. Además, en su etapa forética pueden afectar las habilidades de vuelo y por lo tanto modificar el comportamiento de forrajeo de los individuos (Hubert *et al.*, 2003; Houck y O'Connor, 1991).

De las cinco especies de ácaros encontradas en este estudio, cuatro (*T. putrescentinae*, *P. longanalis*, *P. longipilus*, *Kuzinia* spp) ya habían sido reportadas en asociación con los abejorros nativos *B. atratus* en Uruguay (Revainera *et al.*, 2019). En este caso, además de esas especies se constató en un solo abejorro extraído del campo, la presencia del ácaro *Parasitellus fucorum*. Por otro lado, contrariamente a lo descrito por Revainera *et al.* (2019), en abejorros *B. atratus* de Uruguay, no se encontró *Scutacarus acarorum*. La ausencia de este ácaro puede responder a la baja prevalencia e intensidad en la que se encuentra en el país (Revainera *et al.*, 2019).

El número de abejorros con al menos un ácaro fue importante en los tres grupos estudiados: reinas (73,6 %), obreras de campo (40,5 %) y obreras de laboratorios (65,2 %), indicando que este grupo de parásitos puede afectar de manera importante las poblaciones de *B. atratus*. Las reinas fueron las que presentaron mayor diversidad de ácaros, lo que resulta razonable ya que las reinas son los únicos individuos que sobreviven de la

colonia y los ácaros deben adherirse a sus cuerpos al final del ciclo de la colonia para sobrevivir el invierno (Huck *et al.*, 1998; Schwarz y Huck, 1997; Schmid-Hempel, 1991; Eickwort, 1994).

El Índice de diversidad de Simpson reflejó una diversidad de ácaros decreciente en las reinas, en las obreras de campo y en las obreras, aunque con valores bajos en los tres grupos. Revainera *et al.* (2019) encontraron en reinas y obreras una mayor proporción de individuos con baja diversidad de ácaros (valores entre 0 y 0,3) que individuos con moderada y alta diversidad (0,3-1). Sin embargo, las diferencias reportadas por estos investigadores no fueron tan marcadas como en este estudio, por ejemplo, hallaron que en las obreras, el grupo con mayor proporción de individuos con baja diversidad de ácaros, casi el 20 % presentaba moderada o alta diversidad de ácaros (Revainera *et al.*, 2019).

Las obreras de campo y reinas, presentaron un gran número de ácaros de la especie *T. putrescentinae*, el cual se caracteriza por poseer una distribución cosmopolita, buscando alimentos con alto contenido de grasas y/o proteínas. La cría en cautiverio de abejorros, hace un lugar inmejorable para su proliferación ya que cuenta con numerosos nidos, que representan abundante cantidad de polen y ceras, rico en proteínas y grasas. Adicionalmente, el confinamiento aumenta la falta de higiene lo que hace más difícil controlar la presencia de éste acaro, situación que se ha reportado en crías en laboratorio de otros insectos (Krantz y Walter, 2009).

Las dos especies de *Pneumolaelaps* spp., encontradas tienen hábitos similares a los descritos para *T. putrescentinae* (Hunter y Husband, 1973). Se alimentan directamente del polen y ceras de los nidos, congregándose cercanas a las larvas para recibir el alimento. Aún alimentándose de esta forma, cercana a las larvas, se encuentra muy asociada a las reinas. Esto es coincidente con nuestros resultados ya que ambas especies, *P. longanalis* y *P. longipilus*, se presentaron en mayor número sobre las reinas de *B. atratus* (Bee mites ID, 2019; Royce and Krantz, 1989).

Los ácaros del género *Kuzinia* spp. estuvieron más presentes en obreras de campo y reinas que en obreras de laboratorio. Estos ácaros se alimentan exclusivamente de polen, por lo que pueden encontrar su alimento tanto dentro como fuera del nido de abejorros, estando muy asociadas a obreras y machos de abejorros (Kissinger *et al.*, 2011; Goulson, 2010; Allen *et al.*, 2007). Esto explicaría que sean más abundantes en individuos que estuvieron pecoreando en el campo y no tanto en los abejorros confinados al nido. Por otro lado, su presencia en reinas es esperable ya que éstas fueron colectadas al salir de su hibernación y es en esta etapa en la comienza el ciclo de los abejorros promoviendo la foresis de los ácaros. Sus hábitos foréticos están asociados a abejas, avispa, escarabajos, etc (Delfinado y Baker, 1976). La taxonomía de este grupo está en revisión debido a grandes controversias en la determinación de especies. De acuerdo a algunos taxónomos, existen tres especies: *K. affinis*, *K. laevis* y *K. americana*. Sin embargo, su identificación se ha basado en aspectos morfológicos (números de setas en los tarsos I-IV) que aún no están del todo claros (Revainera *et al.*, 2014; Delfinado y Baker, 1976). Es necesario seguir profundizando estas claves para esclarecer esta situación.

*Parasitellus fucorum* por su parte es un ácaro de gran tamaño, el cual se alimenta de polen y pequeños artrópodos presentes en los nidos de abejorros (Goulson, 2010; Schwarz *et al.*, 1996). Es una de las especies más comunes y suelen estar en altas prevalencias en torno a 28 % (Evans, 1992). Sin embargo, en este estudio apareció en un solo ejemplar, coincidiendo con estudios recientes en los que se constató baja prevalencia o incluso ausencia de este acaro (Revainera *et al.*, 2019; 2014; Maggi *et al.*, 2011).

#### 7.4.4. Virus ARN

La presencia de los virus analizados (BQCV, SBV, DWV y ABPV) fue en términos generales muy alta ya que más del 80% de los abejorros presentaba al menos uno de los virus. El virus BQCV fue detectado en

prácticamente todos los ejemplares infectados, siendo el de mayor frecuencia de aparición. Los otros virus que le siguieron en prevalencia fueron el SBV (17,6 %), el ABPV (17,6 %) y el DWV (6 %). Gamboa et al. (2015) analizaron 14 abejorros de *B. atratus* de colonias criadas en laboratorio y 5 de colonias silvestres encontrando que el DWV y el BQCV estaban en el 100% y el 74% de las muestras, respectivamente, mientras que el SBV y el ABPV tenían una prevalencia mucho menor. Así, se constata una discrepancia importante respecto a la prevalencia del DWV entre los resultados de este estudio y los de Gamboa *et al.* (2015).

Los cuatro virus detectados se encuentran con frecuencia en las abejas melíferas en todo el mundo (Chen y Siede, 2007), incluido Uruguay (Anido *et al.*, 2015; Antúnez et al. 2006). También se han encontrado en otras especies de artrópodos por lo que estos virus pueden considerarse como patógenos multi-huéspedes (Gamboa *et al.*, 2015; Levitt *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012).

Al discriminar por grupo de abejorros, se destaca la mayor infección de las obreras de campo frente a las obreras de laboratorio con los virus BQCV y SBV. Este resultado muestra que las condiciones de confinamiento de los abejorros durante la cría artificial no inciden en un aumento de la virosis. Por el contrario, los abejorros en el campo aparecen más expuestos a los virus BQCV y SBV. Una posible explicación a este fenómeno es que los abejorros estén intercambiando los virus con las abejas melíferas, por ejemplo a través de las flores que ambas especies visitan. En este sentido, recientemente Alger *et al.* (2019) encontraron en abejorros cercanos a colonias de abejas melíferas una mayor prevalencia del DWV y el BQCV, y detectaron virus en el 19% de las flores. Este resultado ilustra cómo puede darse el *spillover* de virus entre dos especies que comparten fuentes de alimento. En el presente estudio llama la atención que el orden de prevalencia de los virus encontrados en los abejorros no difiera mucho del encontrado en abejas melíferas por Anido *et al.* (2015).

En otro estudio, Genersch *et al.* (2006) identificaron el DWV en aproximadamente el 10 % de reinas de *B. terrestris* en un criadero, una prevalencia que no se aleja mucho de la encontrada en este estudio en reinas capturadas en el campo (16,7 %). El DWV es muy conocido en las abejas melíferas y aparece asociado con el ácaro ectoparásito *Varroa destructor* que actúa como inductor de los mismos. Este virus actuando junto a *V. destructor* podría causar pérdidas importantes de colonias de abejas melíferas (Martin *et al.*, 2012; de Miranda y Genersch, 2010). Últimamente se ha prestado mucha importancia a las variantes genéticas de los virus y sus recombinantes, existiendo aun dudas sobre cuál es la más virulenta (Dalmon *et al.*, 2017; Natsopoulou *et al.*, 2017; Mordecai *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2012). Las variantes del DWV presentes en diferentes especies de abejorros y su rol en las poblaciones es un tema aun por abordar.

#### 7.4.5. Consideraciones finales

*A priori* podría considerarse que las condiciones de confinamiento de los abejorros en colonias criadas artificialmente, sumados al abundante alimento y la imposibilidad de volar favorecería la proliferación de parásitos y virus. Sin embargo, al comparar los abejorros obtenidos en el campo de colonias silvestres y los abejorros obtenidos mediante cría artificial encontramos que los primeros presentan mayor prevalencia de *N. ceranae*, de ácaros del género *Kuzinia*, mayor diversidad de ácaros y mayor prevalencia de los virus BQCV y SBV, que los segundos. En los abejorros de laboratorio destaca la presencia de *T. putrescentinae*, pero éste ácaro está más asociado al polen que a los insectos.

Una explicación a esta diferencia es que en el campo los abejorros están en contacto con parásitos y virus de las abejas melíferas, caso *N. ceranae* y los virus, actuando las flores como mediadores de la transmisión (Alger *et al.*, 2019). Otra explicación que podría explicar la mayor cantidad de parásitos y virus en los abejorros de campo es que en este estudio se colectaron pecoreadoras, que pueden ser de mayor edad que los abejorros

extraídos de las colonias artificiales. La edad de los abejorros es un factor no contemplado en este estudio y que puede ser relevante. Por ej. en el caso de las abejas melíferas la nosemosis es mayor en pecoreadoras que en nodrizas (Higes *et al.*, 2010 ).

En las colonias obtenidas mediante cría artificial a partir de reinas capturadas en el campo al inicio de la primavera (Salvarrey *et al.*, 2013) los parásitos y virus que presenten las obreras pueden venir básicamente de dos fuentes: la reina y el polen con que se alimentan las larvas (polen corbicular de abejas melíferas). En este estudio las reinas presentaron todos los parásitos y virus buscados, destacándose un alto nivel de infección por *N. ceranae* (aunque baja prevalencia) y una alta diversidad de ácaros. Esto es esperable si tenemos en cuenta que las reinas son los únicos individuos que sobreviven a la descomposición de la colonia y los parásitos dependen en buena medida de ellas para perdurar en el tiempo hasta que inicien nuevas colonias (Huck y Schmid-Hempel, 1996).

Por último, los resultados de este estudio se suman a los obtenidos por Arbulo *et al.* (2015), Plischuk *et al.* (2016) y Revainera *et al.* (2019) para configurar el panorama sanitario de los abejorros nativos de Uruguay discriminando entre especies, castas y origen de la colonia. Esta información es relevante para futuros estudios en el país y en la región, por ejemplo dirigidos a establecer la transmisión de parásitos y virus entre especies diferentes de ápidos.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las colonias de *Bombus atratus* obtenidas mediante cría artificial se desarrollan sin problemas en diciembre-enero pese a que su ciclo está desestacionalizado respecto a su ciclo natural. Esto permite emplearlos en la polinización de trébol rojo.
2. Los abejorros explotan el trébol rojo como principal fuente de polen y néctar, no obstante también colectan estos alimentos de otras especies botánicas.
3. Los abejorros mostraron un claro gradiente decreciente de distribución en el semillero de trébol rojo desde la ubicación de los nidos.
4. El rendimiento de semillas de trébol rojo alcanzó valores muy importantes en la cercanía de los nidos (709 kg/ha), y pese a la presencia de otros insectos polinizadores, se puede atribuir a los abejorros cerca de 400 kg/ha.
5. Las colonias de *B. atratus* mostraron una buena adaptación a los invernáculos, y las obreras pecorean sobre las flores de tomate sin dificultad.
6. La acción polinizadora de los abejorros permitió mejorar el rendimiento de tomates bajo invernáculo (porcentaje de cuajado y peso), así como el diámetro, número de semillas y número de lóculos de tomate, porcentaje de azúcar y textura.
7. El efecto de los abejorros en la producción de tomates bajo invernáculo es más evidente en condiciones adversas de temperatura y humedad.
8. Los abejorros *B. atratus* presentan una amplia diversidad de parásitos internos, parasitoides, ácaros y virus ARN.
9. Algunos parásitos como *Nosema ceranae* y virus ARN son compartidos con las abejas melíferas y otros insectos, generando un escenario posible para el derrame de patógenos (*spillover*).

10. Las condiciones de cría artificial (confinamiento, abundancia de alimentos, imposibilidad de volar) no favorecen en términos generales a la proliferación de parásitos y virus.

## 9. PERSPECTIVA

Los resultados obtenidos en esta tesis dejan abiertas muchas preguntas que requieren investigaciones específicas en el futuro. A continuación se describen sucintamente cuatro propuestas de investigación como continuación de los temas abordados en esta tesis.

- 1) Los abejorros *B. atratus* mostraron un enorme potencial como polinizadores del trébol rojo. Sin embargo, hay un problema que merece mayor estudio para optimizar su utilización en los semilleros. Aunque los abejorros explotaron el trébol rojo como el principal recurso polinífero y nectarífero, la explotación de otros recursos botánicos “distrajeron” a los abejorros, sacándolos del semillero. Así, es necesario encontrar estrategias de manejo de las colmenas que obliguen a los abejorros a visitar el trébol rojo. Una primera pista surge del grupo de colmenas a las cuales se les retiró el jarabe de azúcar del dispensador. Los abejorros de estas colonias visitaron con mayor frecuencia el semillero para coleccionar néctar y polen. Otra posibilidad es el cerrado transitorio de las colmenas (ej. por un día). Este manejo se fundamenta en que cuando se abrieron las colmenas por primera vez el número de abejorros observado en el semillero fue muy alto. Por último, está la posibilidad de inducir a los abejorros a explotar el trébol rojo en base a formulados específicos con el olor de las flores. Estudios recientes han demostrado que este manejo, probado con éxito en abejas melíferas para algunos cultivos, es factible en abejorros. De obtener resultados positivos estos manejos permitirán reducir el número de colonias de abejorros a utilizar (por tanto los costos de adquirirlas) mejorando la polinización de los semilleros.

- 2) Los estudios realizados polinizando tomates bajo invernáculo con abejorros mostraron que pueden generar importantes beneficios productivos. Sin embargo, el mantenimiento de colonias pobladas durante el tiempo suficiente para que polinicen las flores de varios racimos es un aspecto clave que define la rentabilidad de adquirir colmenas. Los invernáculos suelen utilizar por razones sanitarias cubiertas de nailon con diferente grado de filtro de rayos UV. Observaciones preliminares muestran que un filtrado excesivo de rayos UV afectan el comportamiento de los abejorros disminuyendo el ritmo de actividad, el horario de pecoreo, incrementando el número de abejorros perdidos, con consecuencias directas en el tamaño de la población. La explicación a este problema radica en que los abejorros perciben un rango de colores que incluyen el UV, por lo que al usar materiales que filtran estos rayos en los invernáculos terminan afectando su visión. Estudiar este problema es una condición necesaria para fomentar el uso de abejorros como polinizadores del tomate bajo protección.
- 3) Los abejorros cuentan con una importante comunidad de parásitos internos, ácaros y virus ARN, algunos específicos del género *Bombus* y otros compartidos con las abejas melíferas y otros insectos. En los últimos años, fomentado por el incremento de pérdidas de colonias de abejas melíferas, se han realizado varios estudios que muestran como la calidad de la dieta proteica (diversidad de pólenes) afecta el nivel de infección del microsporidio *Nosema ceranae*, la respuesta inmune y la composición de la microbiota de las abejas. Este aspecto prácticamente no ha sido estudiado en abejorros. El dominio de la técnica de cría de los abejorros y su mantenimiento en condiciones de confinamiento, sumado a la posibilidad de someter a las colonias a ambientes con diferente oferta de recursos permite utilizar a los abejorros nativos como modelo para estudiar el efecto de la nutrición proteica a nivel individual y colonial. Los resultados que se obtengan serán una contribución para entender

como las deficiencias nutricionales pueden afectar las poblaciones de ápidos.

- 4) Los abejorros mostraron ser muy buenos polinizadores del trébol rojo y de tomate en invernáculo, con un potencial importante para aportar beneficios económicos a los dos tipos de producción. Sin embargo, la utilización de abejorros como polinizadores puede extenderse a otros cultivos. Por ejemplo, en los últimos años viene incrementándose la producción de zapallito (*Cucurbita maxima*) y melón (*Cucumis melo*) en invernáculos, aprovechando el buen precio de ambas cucurbitáceas cuando se comercializan temprano. Ambas especies son muy dependientes de la polinización y en cultivos protegidos este problema aparece como una limitante importante en la producción. Los abejorros, con su probado buen comportamiento en los invernáculos, aparecen como buenos candidatos para polinizar el zapallito y el melón.

## 10 .BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla FC, Sampaio G, Pedrosa M, Sipriano TP, Domingues CEC, Silva-Zacarin ECM, Camargo DA. 2014. Larval development of *Physocephala* (Diptera, Conopidae) in the bumble bee *Bombus morio* (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira Entomología*, 58 (4): 343–348.
- Abrahamovich AH, Díaz NB, Lucía M. 2005. Las especies del género *Bombus* Latreille en Argentina (Hymenoptera: Apidae). Estudio taxonómico y claves para su identificación. *Neotropical Entomology*, 34(2): 235-250.
- Abrahamovich AH, Díaz NB, Morrone JJ. 2004. Distributional patterns of the Neotropical and Andean species of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) *Acta Zoológica mexicana*. vol.20 no.1 Xalapa abr. 2004.
- Abrahamovich AH, Díaz NB. 2002. Bumble bees of the Neotropical region (Hymenoptera: Apidae). *Biota Colombiana*, 3(2): 199-214.
- Ahmad M, Bodlah I, Mehmood K, Ayyaz U, Sheikh A, Aziz MA. 2015. Pollination and Foraging Potential of European Bumblebee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) on Tomato Crop under Greenhouse System. *Pakistan Journal of Zoology*, vol. 47(5): 1279-1285.
- Aizen MA, Smith-Ramírez C, Morales CL, Vieli L, Sáez A, Barahona-Segovia RM, Arbetman MP, Montalva J, Garibaldi LA, Inouye DW, Harder LD. 2018. Coordinated species importation policies are needed to reduce serious invasions globally: The case of alien bumblebees in South America. *Journal of Applied Ecology* 2018: 1-7.
- Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein AM. 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annual Botanic*, 103: 1579–1588.
- Aldabe L. 2000. Producción de hortalizas en Uruguay. Montevideo, Épsilon. 269 p.
- Aldana J, Cure JR, Almanza MT, Vecil D, Rodríguez D. 2007. Efecto de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) sobre la productividad de

- tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana*, Vol 25 (1): 62-72.
- Alford DV. 1975. *Bumblebees*. Davis-Poynter, London.
- Alger SA, Burnham PA, Boncristiani HF, Brody AK. 2019. RNA virus spillover from managed honeybees (*Apis mellifera*) to wild bumblebees (*Bombus* spp.). *PLoS One* 14, 13 pp. e0217822.
- Almanza, M.T., Cure, J.R. y Wittmann, D. (2006). Neotropical bumblebee rearing to pollinate crops: a way to sustainable agriculture in Colombia. Association of Institutes for Bee Research. Report of the 53<sup>rd</sup> seminar in Hohenheim, 28-30 marzo 2006.
- Amaya P, Peña L, Mosquera A, Villada H, Villada. 2010. Efecto del uso de recubrimiento sobre la calidad del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill ). *Dyna*, 162: 67-73.
- Alvarez L, Reynaldi F, Ramello PJ, Garcia MLG; Sguazza GH, Abrahamovich AH, Lucia M. 2018. Detection of honey bee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Insectes Soc.* 65, 191–197 (2018).
- Anido M, Branchiccela B, Castelli L, Harriet J, Campá J, Zunino P, Antúnez K. 2015. Prevalence and distribution of honeybee pathogens in Uruguay. *Journal Apicultural Research*, 54(5):532-540.
- Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:67–70.
- Arbetman MP, Meeus I, Morales CL, Aizen MA, Smagghe G. 2012. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive Bumblebee. *Biological Invasions*, 15(3): 489-494.
- Arbulo N, Antúnez K, Salvarrey S, Santos E, Branchiccela B, Martín-Hernández R, Higes M, Invernizzi C. 2015. High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *Journal Invertebrate Pathology*, 130: 165-168.

- Arbulo N, Santos E, Salvarrey S, Invernizzi C. 2011. Proboscis Length and Resource Utilization in Two Uruguayan Bumblebees: *Bombus atratus* Franklin and *Bombus bellicosus* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology*, 40: 72–77.
- Argerich C, Gaviola J. 1995. Manual de producción de semillas hortícola. 81pp.
- Ashman TL et al. (2004) Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85, 2408–2421.
- Astegiano ED, Vegetti AC, Favaro JC. (1982). Efecto de las aplicaciones de ácido giberelico y ácido B-nantoxiacetico sobre la producción temprana de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Trabajo presentado en la IV reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Olericultura, Salta, Argentina.
- Bailes EJ, Deutsch KR, Bagi J, Rondissone L, Brown MJF, Lewis OT. 2018. First detection of bee viruses in hoverfly (syrphid) pollinators. *Biology Letters*, 14: 4 pp.
- Bailey L, Gibbs AJ. 1964. Acute infection of bees with paralysis virus. *Journal of Insect Pathology*, 6: 395–407.
- Barrios B, Pena SR, Salas A, Koptur S. 2016. Butterflies visit more frequently, but bees are better pollinators: the importance of mouthpart dimensions in effective pollen removal and deposition. *AoB PLANTS*, 8: plw001; doi:10.1093/aobpla/plw001
- Bashir MA, Alvi AM, Rehmani MIA, Qasirani TB, Mahpara S, Tariq M. 2019. Pollinators diversity for tomatoes crop under agro-forest ecosystem of Dera Ghazi Khan Punjab Pakistan. *Pure and Applied Biology*, 8(2):1487-1493.
- Bergman P, Molau U, Holmgren B. 1996. Micrometeorological impacts on insect activity and plant reproductive success in an alpine environment, Swedish Lapland. *Arct. Alp. Res.*, 28, 196–202.

- Binns ES. 1982. Phoresy as migration-some functional aspects of phoresy in mites. *Biological Reviews*, 57(4): 571–620. doi:10.1111/j.1469-185X.1982.tb00374
- Bohart GE. 1957. Pollination of alfalfa and red clover. *Annual Review of Entomology*, 2: 355-380.
- Bommarco R, Lunding O, Smith HG, Runlöf M. 2011. Drastic historic shifts in bumble-bee community composition in Sweden Email alerting service Drastic historic shifts in bumble-bee community composition in Sweden. *Proceedings of the Royal Society Biological Science*. 7 pag. doi:10.1098/rspb.2011.0647.
- Branchiccela B, Castelli L, Corona M, Días-Cetti S, Martínez de la Escalera G, Invernizzi C, Santos E, Silva C, Zunino P, Antúnez K. 2019. Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Sci Rep* 9, 10156, doi:10.1038/s41598-019-46453-9
- Brodie L. 1996. Bumblebee foraging preferences: differences between species and individuals. Tesis para el grado B. Sc. (Hons.) en Ecología en la Universidad de Aberdeen.
- Brown MJF. 2017. Microsporidia: An Emerging Threat to Bumblebees? *Trends in Parasitology* 2017(10):754-762. doi: 10.1016/j.pt.2017.06.001.
- Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF, Griswold TL. 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS*, 108: 662 – 667.
- Cameron SA, Williams PH. 2003. Phylogeny of bumblebees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 28: 552-563.
- Carámbula M. 1981. Producción de semillas de plantas forrajeras. Editorial Hemisferio Sur, 518 p. Montevideo, Uruguay.
- Castellanos JZ. 2009. *Manual de producción de tomate en invernadero*. Celaya, Guanajuato, México.



- Chaplin-Kramer R, Sharp RP, Weil C, Bennett EM, Pascual U, Arkema KK, Brauman KA, Bryant BP, Guerry AD, Haddad NM, Hamann M, Hamel P, Johnson JA., Mandle L, Pereira HM, Polasky S, Ruckelshaus M, Shaw MR, Silver JM, Vog AL, Daily GC. 2019. Global modeling of nature's contributions to people. *Science*, 366: 255–258.
- Chen YP, Siede R, 2007. Honey Bee Viruses, in: Karl Maramorosch, A.J.S. and F.A.M. (Ed.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 33–80.
- Colla SR, Otterstatter MC, Gegear R, Thomson JD. 2006. Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation*, 129, 461–467. doi: 10.1016/j.biocon.2005.11.013
- Cruz B, Cure JR, Almanza MT. 2008. Implementación de mejoras para la cría en cautiverio de colonias del abejorro nativo *Bombus pauloensis* (= *B. atratus*) (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Facultad de Ciencias - Universidad Militar Nueva Granada*, 4: 70-83.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, 287: 443-449.
- Cameron, S. A., Hines, H. M., Williams, P. H. (2007) A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biol. J. Linn. Soc.* 91, 161–188.
- Dalmon A, Desbiez C, Coulon M, Thomasson, M. Le Conte Y, Alaux C, Vallon J, Moury B. 2016. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Scientific Reports*, 7:41045. DOI: 10.1038/srep41045
- Dasgan A, Zdoúan O. 2004. Effectiveness of Bumblebee Pollination in Anti-Frost Heated Tomato Greenhouses in the Mediterranean Basin. *Turk J Agric For*, 28: 73-82.

- De Santis L. 1989 Parasitoide e hiperparasitoide de un insecto polinizador de Argentina, Bolivia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil. Academia Nacional Agronomía Veterinaria, 53 (2): 5-8.
- DIEA 2018. Dirección de Informática y Estadística Agropecuaria (DIEA). [Internet]. Montevideo, Uruguay; Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca; 2015. [Revisado 2015-2016, citado 2017]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>.
- Dogliotti S. 2011. Bases Fisiológicas del crecimiento y desarrollo de los principales cultivos hortícolas. Material de apoyo para Curso de Fisiología de los Cultivos – Módulo Horticultura Facultad de Agronomía – Universidad de la República.
- Dogterom MH, Matteoni JA, Plowright RC. 1998. Pollination of greenhouse tomatoes by the North American *Bombus vosnesenskii* (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology, 91(1): 71-75.
- Dornhatus A, Chittka L. 2005. Bumblebees (*Bombus terrestris*) store both food and information in honeypots. Behavioral Ecology & Sociobiology, 50: 570-576.
- Dupont YL, Damgaard C, Simonsen V. 2011. Quantitative Historical Change in Bumblebee (*Bombus* spp.) Assemblages of Red Clover Fields. PLoS ONE 6(9): e25172. doi:10.1371/journal.pone.0025172
- Dyer AG, Chittka L. 2004. Bumblebee search time without ultraviolet light. The Journal of Experimental Biology, (207): 1683-1688.
- Elbgami T, Kunin WE, Hughes WOH, Biesmeijer JC. The effect of proximity to a honeybee apiary on bumblebee colony fitness, development, and performance. *Apidologie*, 45: 504–513.
- Estay P. 2007. *Bombus* en Chile: especies, biología y manejo. Colección libros INIA N° 22. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura. Santiago de Chile, Chile.
- Estay P, Wagner A, Escaff M. 2001. Evaluación de *Bombus dahlbomii* (Guér.) como agente polinizador de flores de tomate (*Lycopersicon*

- escuelentum (Mill.)), bajo condiciones de invernadero. *Agricultura Técnica*, Chile, 61(2): 113-119.
- Evans E. 2017. From Humble Bee to Greenhouse Pollination Workhorse: Can We Mitigate Risks for Bumble Bees? *Bee World* 94: 34-41.
- Evans GO. 1992. *Principles of Acarology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- FAO. 2019. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, División Estadística (FAOSTAT). [Internet]. Roma, Italia. [revisado 2016, citado 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/publications/es/>
- FAO. 2018. Food and Agriculture organization of the United Nations. Rome, Italy. 2018, 364 pp.
- Formoso F. 2010. Producción de semillas de especies forrajeras. Montevideo: INIA. Serie Técnica, N°190.
- Franklin H. 1912. The Bombidae of the New World. *Transactions of the American Entomological Society*, 38 38, 177- 486.
- Free JB. 1993 (2ª Ed.). *Insect pollination of crops*. Academic Press. Londres, San Diego.
- Free JB. 1970. *Insect pollination of crops*. Academic Press, London. 544 p.
- Free JB. 1965. The ability of bumble bees and honeybees to pollinate red clover. *Journal of Applied Ecology*, 2: 289 – 294.
- Freitas BM, Imperatriz-Fonseca VL, Medina LM, Kleinter AMP, Galetto L, Nates-Parra G, Quezada-Euán JJG. 2009. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332–346.
- Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 73-79
- Fries I, Feng F, da Silva A, Slemend SB, Pieniazek NJ, 1996. *Nosema ceranae* n. Sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian

honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* 32: 356–365

- Fürst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MF. 2014. Disease associations between honey bees and bumblebees as a threat to the wild pollinators. *Nature* 506, 364–366.
- Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissière BE. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economic*, 68(3): 810-821.
- Gamboa V, Ravoet J, Brunain M, Smaghe G, Meeus I, Figueroa J, Riaño D, de Graaf DC. 2015. Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. *Journal of Invertebrate Pathology* 129: 36-39.
- García JA, Rebuffo M, Formoso F, Astor D. 1991. Producción de semillas forrajeras: Tecnologías en uso. Montevideo: INIA. (Serie Técnica, No 2).
- Garófalo C. 1979. Observações preliminares sobre a fundação solitaria de colonias de *Bombus* (FervodoBombus) *atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae). *Boletim de Zoologia, Universidade Sao Paulo*. 4:53-64.
- Gegear RJ, Otterstatter MC, Thomson JD. 2006. Bumble-bee foragers infected by a gut parasite have an impaired ability to utilize floral information. *Proceedings of Royal Society. London B* 273, 1073–1078.
- Geldmann J, González-Varo JP. 2018. Conserving honey bees does not help wildlife. *Science* 359: (6374): 392–393.
- Genersch E, Yue C, Fries I, de Miranda JR. 2006. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* 91:61–63.
- Gennari G. 2012. La polinización aumenta los rindes en un 70% de los cultivos. INTA Informa 167- Apicultura 1, Argentina.
- Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347 (6229): 1255957-1- 1255957-9

- Goulson D. 2010. Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America. *Applied Entomology and Zoology* 45: 7-12
- Goulson D. 2008. Conservation of bumblebees. in *Species Management: Challenges and solutions for the 21st century*. Chapter 27. 6, 477–492.
- Goulson D. 2003. *Bumblebees: their behaviour and ecology*. Oxford University Press, UK.
- Graystock P, Meeus I, Smagghe G, Goulson D, Hughes WOH. 2016. The effects of single and mixed infections of *Apicystis bombi* and deformed wing virus in *Bombus terrestris*. *Parasitology*, 143: 358–365.
- Graystock P, Goulson D, Hughes WOH. 2015. Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 282: 1-7
- Graystock P, Yates K, Evison SEF, Darvill B, Goulson D, Hughes WOH. 2013 a. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology*, 3–11. doi:10.1111/1365-2664.12134
- Graystock P, Yates K, Darevill B, Goulson D, Hughes WOH. 2013 b. Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 114–119.
- Heinrich B. 2004. *Bumblebee Economics*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Hicks BJ, Pilgrim BL, Perry E, Marshall HD. of *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) and the potential for pathogen spillover Observations of native bumble bees inside of commercial colonies of *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) and the potential for pathogen spillover. (2018). doi:10.4039/tce.2018.28
- Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías, Martín-Hernández R. 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29.

- Higes M, Palencia PG, Botías C, Meana A, Martín-Hernandez R. 2010. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environ. Microbiol. Reports*. 2: 745-748.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido Bailón E, González-Porto AV, Barrios L, del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, García Palencia P, Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10(10):2659-2669.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 93–95.
- Hogendoorn K, Bartholomaeus F, Keller MA. 2010. Chemical and sensory comparison of tomatoes pollinated by bees and by a pollination wand. *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1286–1292.
- Holm N. 1966. The utilization and management of bumble bees for red clover and alfalfa seed production. *Annual Reviews of Entomology*, 11: 155-186.
- Huang WF, Jiang JH, Chen YW, Wang CH. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38 (1): 30-37.
- Hubert J, Stejskal V, Kubátová A, Munzbergová Z, Váňová M, Žd'árková E. 2003. Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. *Experimental and Applied Acarology* 29: 69-87.
- Huck K, Schwarz M, Schmid-Hempel P. 1998. Host choice in the phoretic mite *Parasitellus fucorum* (Mesostigmata: Parasitidae): Which bumble bee caste is the best? *Oecologia*, 115(3):385–390. doi:10.1007/s004420050532
- Hunter PE, Husband RW. 1973. *Pneumolaelaps* (Acarina: Laelapidae) mites from North America and Greenland. *Florida Entomologist*, 77-91.
- Hunter PE. 1966. The genus *Pneumolaelaps* with description of three new species (Acarina: Laelaptidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 39, 357-369.

- INASE 2019. Instituto Nacional de Semillas. Available: <https://www.inase.uy/Estadistica/> (Accessed Noviembre 2019).
- InfoStat. 2008. Manual de usuario. Primera edición. Córdoba, Argentina. Grupo InsoStat, Universidad Nacional de Córdoba; 2008.
- Invernizzi C, Santos E, García E, Daners G, Di Landro R. Cabrera C, Saadoun A. 2011. Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in Eucalyptus grandis plantations. *Archivos de zootecnia*, 60:1303 – 1314.
- Izaguirre P, Beyhaut R. 1997. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas: Parte 1 -Papilionoideae (Faboideae). Montevideo: Hemisferio Sur.
- Kaftanoglu O. 2000. The diversity and faunistics of bumblebees for pollination in greenhouses. pp. 73-82. En: Sommeijer, M. y A. de Ruitjer (eds). *Insect pollination in greenhouse*. The Netherlands. 220 p
- Kearns CA, Thomson JD. 2001. The natural history of bumblebees. A sourcebook for investigations. University Press Colorado. Boulder, Colorado, USA.
- Kearns CA, Inouye DW, Waser NM. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 83-112.
- Kevan PG, Straver WA, Offer M, Laverty TM. 1991. Pollination of greenhouse tomatoes by bumblebees in Ontario. *Proceeding of the Entomological Society of Ontario*, 122: 15-19.
- King MJ. 1993. Buzz foraging mechanism of bumble bees. *Journal of Apicultural Research*, 32: 41–49.
- Kissinger CN, Cameron SA, Thorp RW, Leellen BW, Solter F. 2011. Survey of bumble bee ( *Bombus*) pathogens and parasites in Illinois and selected areas of northern California and southern Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107: 220–224.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing

- landscapes for world crops. *Proceeding of the Royal Society*, 274: 303-313.
- Knutson L, Murphy WL. (1990) Diptera (flies) as pests of honeybees, in: Morse, R. A. (Ed.), Honey bee pests, predators and diseases. Cornell University Press, New York, pp. 121–134.
- Krantz GW, Walter DE. 2009. A manual of acarology, 3rd edn. Texas Tech University Press, Lubbock.
- Lautenbach S, Seppelt R, Liebscher J, Dormann C F. 2012. Spatial and temporal trends of global pollination benefit. *PLoS One* 7 (4): 15 p.
- Levitt AL, Singh R, Cox-Foster DL, Rajotte E, Hoover K, Ostiguy N, Holmes EC. 2013. Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Research* 176: 232– 240.
- Li J, Chen W, Wu J, Peng W, An J, Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R. 2012. Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. *Int. Journal Parasitology*, 42: 49-61.
- Li J, Wu J, Wenjun P, Jiandong A, Zhanbao G, Yuemin T. 2005. *Nosema bombi*, a microsporidian pathogen of the bumble bee *Bombus lucorum*. *Journal of Apicultural Science* 49 (1): 53-57.
- Littell RC, Stroup WW, Freund RJ. 2007. SAS for Lineal Models. Fourth Edition. SAS Institute Incorporate, Cary, North Carolina, USA.
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. 1978. Methods of melissopalynology, *Bee World*, 59:4, 139- 157.
- Lucia M, Telleria MC, Ramello JP, Abrahamovich AH. 2017. Nesting ecology and floral resource of *Xylocopa augusti* Lapeletier de Saint Fargeau (Hymenoptera, Apidae) in Argentina. *Agricultural and Forest Entomology*, 2017: 13pp.
- Lucia M, Reynaldi FJ, Sguazza GH, Abrahamovich AH. 2014. First detection of deformed wing virus in *Xylocopa augusti* larvae (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Journal Apicultural Research*, 53: 466–468.

- Lucía, M., Alvarez, L. J., Abrahamovich, A. H. 2013. First record of *Melaloncha* (Diptera: Phoridae) parasitoid associated with *Bombus* (Apidae: Bombini) in Argentina. *Journal Apicultural Research*, 52 (2): 72-73.
- Maggi M, Lucia M, Abrahamovich AH. 2011. Study of the acarofauna of native bumblebee species (*Bombus*) from Argentina. *Apidologie* 42: 280-292.
- Manley R., Boots M. and Wilfert L. 2015. Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *Journal of Applied Ecology* 52: 331–340.
- Matheson A. 1996. *Bumble Bees for pleasure and profit*. International Bee Research Association (IBRA). Cardiff, UK.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC. 2012. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science* 336, 1304–1306.
- Martínez S, Garbi M, Carbone A, Morelli G, Argerich C, Pacheco R, Puch L. 2016. Aplicación de reguladores auxínicos: efecto sobre el cuajado de fruto en tomate para consumo fresco. *Horticultura Argentina*, 35 (87): 30-40.
- Michener CD. 2007 (2nd ed.). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, USA.
- Michener CD. 1974. *The Social behavior of Bees. A comparative study*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Monge J, Loría M. 2019. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivado bajo invernadero: correlaciones entre variables. *Tecnología en Marcha*, 32(3): 37-54.
- Morales CL, Arbetman MP, Cameron SA, Aizen MA. 2013. Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11: 529–534.
- Morandin LA, Laverly TM, Kevan PG. 2001a. Effect of bumblebees (Hymenoptera: Apidae) pollination intensity on the quality of

- greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*. 94 (1): 172-179.
- Morandin LA, Lavery TM, Kevan PG. 2001b. Bumble Bee (Hymenoptera: Apidae) Activity and Pollination Levels in Commercial Tomato Greenhouses. *Journal of Economic Entomology*. 94(2): 462-467.
- Moure J, Melo G. 2012. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Available from: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue> (accessed 26.04.17).
- Müller CB. 1994. Parasitoid induced digging behaviour in bumblebee workers. *Animal Behaviour*, 48(4): 961-966.
- Müller CB, Schmid-Hempel P. 1993. Exploitation of cold temperature as defence against parasitoids in bumblebees. *Nature* 363, 65-66.
- Murray TE, Coffey MF, Kehoe E, Horgan FG. 2013. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation* 159: 269–276.
- Natsopoulou ME, McMahon DP, Doublet V, Frey E, Rosenkranz P, Paxton RJ. 2017. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. *Scientific Reports* 7: 5242 | DOI:10.1038/s41598-017-05596-3
- Nemésio, A., 2009. Orchid bees (Hymenoptera, Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* 2041, 1-242.
- Neumann P, Carreck NL. 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*: 49(1): 1-6.
- Nunes da Silva P, Hnrcir M, Shipp L, Imperatriz-Fonseca VL, Kevan PG. 2012. The behaviour of *Bombus impatiens* (Apidae, Bombini) on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill., Solanaceae) flowers: pollination and reward perception. *Journal of Pollination Ecology*, 11(5): 33-40.
- Ogilvie JE, Griffin JE, Gezon ZJ, Inouye BD, Underwood N, Inouye DW, Irwin RE. 2017. Interannual bumble bee abundance is driven by indirect climate effects on floral resource phenology. *Ecology Letters* 20: 1507-1515.

- Palacio MA. 1987. Estudio de la relación planta polinizador para la producción de semilla de trébol rojo (*Trifolium pratense* L) en el SE de la Provincia de Buenos Aires. Trabajo de graduación. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias. Balcarce, Argentina.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38: 558–565.
- Peterson AG, Furgala B, Holdaway FG. 1960. Pollination of red clover in Minnesota. *Journal of Economic Entomology*, 53: 546-550.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Plischuk S, Lange CE. 2016. *Bombus brasiliensis* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) infected with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Revista Brasileira Entomología* 60(4): 347-351.
- Plischuk S, Salvarrey S, Arbulo N, Santos E, Skevington J, Kelso S, Revainera P, Maggi M, Invernizzi C, Lange C. 2016. Pathogens, parasites, and parasitoids associated with bumble bees (*Bombus* spp.) from Uruguay. *Apidologie* 48: 298-310.
- Plischuk S, Sanscrainte ND, Becnel JJ, Estep AS, Lange C. E. 2015. *Tubulinosema pampeana* sp. n. (Microsporidia, Tubulinosematidae), a pathogen of the South American bumble bee *Bombus atratus*. *Journal Invertebrate Pathology* 126, 31–42.
- Plischuk S, Lange CE. 2012. *Sphaerularia bombi* (Nematoda: Sphaerulariidae) parasitizing *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) in southern South America. *Parasitology Research* 111, 947-950.
- Plischuk S, Martín-Hernández R, Prieto L, Lucía M, Botías C, Meana A, Abrahamovich AH, Lange C, Higes M. 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*). *Environment Microbiology. Reports* 1, 131-135.

- Porrini MP, Porrini LP, Garrido PM, Silva Neto CM, Porrini DP, Muller F, Nuñez LA, Alvarez L, Fernandez Iriarte P, Eguaras MJ. 2017. *Nosema ceranae* in South American Native Stingless Bees and Social Wasp. *Microbial Ecology*, 74(4).
- Plowright RC, Hartling LK. 1981. Red clover pollination by bumble bees: a study of the dynamics of a plant-pollinator relationship. *Journal of Applied Ecology*, 18, 639-647.
- Poinar GO Jr, van der Laan PA. 1972. Morphology and life history of *Sphaerularia bombi*. *Nematológica* 18, 239-252.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 345–353.
- Ptacek V, Drobna J. 2006. Cría y uso de los abejorros para la polinización de los recursos genéticos de legumbres forrajeras. En: Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas, pp: 124-138. Ed.: CIFA La Majonera- La Cañada IFAPA. La Majonera (Almería), España.
- Putatunda, B.N., Aggarwal, K., Kapil, R.P. 1983. Two new species of *Kuzinia* (Acarina: Acaridae) associated with bees (Hymenoptera) from India. *Indian Journal of Acarology*, 8(2), 57-62.
- Ramírez H. 2003. El uso de hormonas en la producción de cultivos hortícolas para exportación [Internet]. Mexico; En: Memorias del 3er Simposio Nacional de Horticultura, Producción, Comercialización y Exportación de Cultivos Hortícolas, México [revisado 2015-2016; citado 2018]. Disponible en: <http://www.uaaan.mx/postgrado/images/files/hort/simposio3/Ponencia08.pdf>.
- Rao S, Stephen WP. 2009. Bumble bee pollinators in red clover seed production. *Crop Science*, 49, 2207-2214.
- Rao S, Stephen WP, Bergh J. 2007. Comparison of red clover pollination by commercial and native bees in seed production fields in the Willamette Valley. In Young, W.C., Ed., *Seed Production Research*, Oregon State University Publication 127: 59-62.

- Revainera PD, Salvarrey S, Santos E, Arbulo N, Invernizzi C, Plischuk S, Abrahamovich AH, Maggi MD. 2019. Phoretic mites associated to *Bombus pauloensis* and *Bombus bellicosus* (Hymenoptera: Apidae) from Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 58(3): 455-462.
- Revainera P, Lucia M, Abrahamovich AH, Maggi, M. 2014. Spatial aggregation of phoretic mites on *Bombus atratus* and *Bombus opifex* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Apidologie* 45 (5): 579-589.
- Riaño D, Pacateque J, Cure JR, Rodríguez D. 2015. Comportamiento y eficiencia de polinización de *Bombus atratus* Franklin en pimentón (*Capsicum annum* L.) sembrado bajo invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 9(2): 259-267.
- Rosado MA, Ornos C. 2013. Polinizadores y diversidad. Editan: Asociación española de Entomología, Jardín Botánico Atlántico y Centro Iberoamericano de la Diversidad. 160pp
- Rossi N, Santos E, Salvarrey S, Arbulo N, 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.
- Rotheray EL, Osborne JL, Goulson D. 2017. Quantifying the food requirements and effects of food stress on bumble bee colony development. *Journal Apicultural Research*, 56: 288–299.
- Rozéj E, Witaliński W, Szentgyörgyi H, Wantuch M, Morón D, Woyciechowski M. 2012. Mite species inhabiting commercial bumblebee (*Bombus terrestris*) nests in Polish greenhouses. *Experimental and Applied Acarology* 56, 271-282.
- Ruz L. 2002. Bee pollinators introduced to Chile: a review. IN: Kevan, P. & Imperatriz Fonseca, V.L. (eds) - *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature* - Ministry of Environment / Brasília. p.155-167.
- Salinas Navarrete, J.C. 2010. Polinización de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero en México. 6to. Simposio Nacional de

- Horticultura. Producción de Tomate en el norte de México. Saltillo, Coahuila, México, 2010. pp: 127-138. ISBN: 978-607-7692-24-9.
- Salunkhe DK, Jadhav SJ, YU MU. 1974. Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes Quality Plant. - H.Fds.hum.Nutr. XXIV, 1/2 :85-113.
- Salvarrey S. 2019. Ficha zoológica *Bombus atratus* (Franklin 1912) (Hymenoptera: Apidae). *Noticias de la SZU*, 44: 34-36.
- Salvarrey S, Arbulo N, Rossi C, Santos E, Salvarrey L, Invernizzi C. 2017. Utilización de abejorros nativos (*Bombus atratus* Franklin y *Bombus bellicosus* Smith) para mejorar la producción de semillas del trébol rojo (*Trifolium pratense*). *Agrociencia Uruguay* 21(1): 95-104.
- Salvarrey S, Arbulo N, Santos E, Invernizzi C. 2013. Cría artificial de abejorros nativos *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* (Hymenoptera, Apidae). *Agrociencia Uruguay* 17(2): 75-82.
- Salvarrey S. 2012. Utilización de los abejorros nativos, *Bombus atratus* Franklin y *Bombus bellicosus* Smith para mejorar la producción de semillas del trébol rojo (*Trifolium pratense*). Tesis presentada para la obtención del título Magister en Ciencias Agrarias de la Unidad de Posgrado de Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 94 pags.
- Salvarrey, S. 2009. Constancia floral en los abejorros nativos *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus*. Tesis para la obtención del título de Licenciatura de Ciencias Biológicas opción Etología. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay.
- Santos E, Arbulo N, Salvarrey S, Invernizzi C. 2017. Distribución de las especies del género *Bombus* Latreille (Hymenoptera, Apidae) en Uruguay. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 76(1-2): 22-27.
- SAS institute Inc. 2006. SAS/Procedures guide versión SAS 9.1.3. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.

- Santos E, Díaz R, Mendoza Y. 2014. Libro de resúmenes del 13° Congreso Nacional de Horti-fruticultura, 3 al 6 de setiembre de 2014. 136pp.
- Schmid-Hempel R, Eckhardt M, Goulson D, Heinzmann D, Lange C, Plischuk S, Escudero LR, Salathé, Scriven JJ, Schmid-Hempel P. 2014. The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *Journal of Animal Ecology* 83 (4): 823–837.
- Schmid-Hempel P. 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften* 88: 147-158.
- Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P. 1991. Endoparasitic flies, pollen-collection by bumblebees and potential host parasite conflict. *Oecologia* 87:222-232.
- Schwarz HH, Huck K. 1997. Phoretic mites use flowers to transfer between foraging bumblebees. *Insectes Sociaux*, 44(4), 303–310. doi:10.1007/s000400050051
- Serrani Yarce JC. 2008. Interacción de Giberelinas y Auxinas en la fructificación del tomate. 2008;152. Available from: <https://riunet.upv.es/handle/10251/2242>
- Silva-Neto C, Lima FG, Gonçalves BB, Lima LB, Bergamini BAR, Elias MAS, Franceschinelli EV. 2013. Native bees pollinate tomato flowers and increase fruit production. *Journal of Pollination Ecology*, 11(6), p: 41-45.
- Sokolova YY, Sokolov IM, Carlton CE. 2010. Identification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 71–73.
- Solter LF, Becnel JJ, Oi, DH. 2012. Microsporidian entomopathogens, in: Vega, F., Kaya, H. (Eds.), *Insect pathology and microbial control*. Academic Press, San Diego, pp. 221–264.

- Solter L.F. 2008. Microsporidia (Phylum Microsporida). In Encyclopedia of Entomology. Capinera J. L. (Ed.). Second Edition. Springer Science Business Media B.V. pp 2380-2383.
- Stefanescu C, Aguado LO, Asís JD, Baños-Picón L, Cerdá X, Marcos García MÁ, Micó E, Ricarte A, Tormos J. 2018. Diversidad de insectos polinizadores en la península ibérica. *Ecosistemas* 27(2): 9-22.
- Tomiaë D, Stevoviaë V, Đuroviaë D, Stanisavljeviaë R. 2014. Effect of cobalt application on seed production in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16, 517-526.
- Taylor NL, Quesenberry KH. 1996. Red Clover Science. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 226 p.
- Torres E, Gómez J. 2009. Evaluación de diferentes tipos de dieta para la iniciación de colonias de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) en cautiverio. Trabajo de grado. Universidad Militar Nueva Granada, Colombia.
- Ueira-Vieira C, Almeida LO, Almeida FC, Amaral IMR, Brandeburgo MAM, Bonetti AM. 2015. Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. *Apidologie* 46, 628–630.
- Umaerus M, Akerberg E. 1959. Pollination and seed setting in red clover and lucerne under scandinavian conditions. *Herbage Abstracts*, 29(3): 157-164.
- Undeen HH, Vávra J. 1997 Research methods for entomopathogenic protozoa, in: Lacey, L. (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, New York, pp. 117–151.
- Vallejo FA. 1999. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Universidad Nacional de Colombia- Sede Palmira. 75 pp. ISBN: 958-8095-02-6.
- van den Eijnde J, de Ruijter A, van der Steen J. 1991. Method for rearing *Bombus terrestris* continuously and the production of bumblebee colonies for pollination purposes. *Acta Horticulturae* 288: 154-158.

- van Doorn A. 2006. Factores que influyen en el funcionamiento de las colonias de abejorros en invernadero. En: Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas, pp: 158-171. Ed.: CIFA La Majonera- La Cañada IFAPA. La Majonera (Almería), España.
- van Ravestijn W, van der Sande J. 1991. Use of bumblebees for the pollination of glasshouse tomatoes. *Acta Horticulturae*, 288: 204-212.
- Vanbergen AJ. 2013. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. (en colaboración con the Insect Pollinators Initiative). *Frontiers in Ecology and the Environment* 11: 251–259.
- Vanderplanck M, Moerman R, Rasmont P, Lognay G, Wathélet B, Wattiez R, Michez D. 2014. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PLoS One* 9, e86209. doi:10.1371/journal.pone.0086209
- Varela G, Rebuffo M. 1999. Utilización de abejorros (*Bombus* sp.) para aumentar la producción de semilla de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en túneles de aislamiento. Montevideo: INIA.
- Velthuis HHW. 2002. The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction to agriculture. IN: Kevan P, Imperatriz Fonseca, V.L. (eds.) – Pollinating Bees – The Conservation Link Between Agriculture and Nature- Ministry of Environment, Brasilia, pp. 177-184.
- Velthuis HHW, van Doorn A. 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37: 421–451.
- Vergara, CH., Fonseca-Buendía, P. & Aguirre-Sánchez, A. 2006. Evaluación de la eficiencia de *Bombus ephippiatus* Say (Hymenoptera, Apidae) como polinizador de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. Memoria del 4o. Encuentro de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria y Agroindustrial en el Estado de Puebla, México.
- Wilczek M, Ewintal M. 2008. Effect of the methods of additional feeding with

- microelements (B, Mi) on the yield structure and seed yield of red clover. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 11(4), 5.  
Recuperado de [http:// www.ejpau.media.pl/volume11/issue4/art-05/](http://www.ejpau.media.pl/volume11/issue4/art-05/)
- Williams PH, Osborne JL. 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40: 367–387.
- Wojcik VA, Morandin LA, Davies Adams L, Rourke KE. 2018. Floral Resource Competition between Honey Bees and Wild Bees: Is There Clear Evidence and Can We Guide Management and Conservation? *Environmental Entomology*, 47: 822–833.
- Wolf S, Moritz RFA. 2008. Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39: 419–427.
- Woodrow AW. 1952. Pollination of the red clover flower by the honey bee. *Journal of Economic Entomology*, 45: 1028-1029.