



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA

**Incidencia de las recompensas
florales en la producción de
semilla híbrida de girasol**

Ing. Agr. Gisela Grandinetti

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre junio de 2014 y febrero de 2022, bajo la dirección de la Dra. Cecilia Pellegrini y del Dr. Gustavo Orioli (Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur).

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/.../..... ,
mereciendo la calificación de(.....)

*“La educación es el arma más poderosa
que puedes usar para cambiar el mundo”*

Nelson Mandela.

A mis abuelos...

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora Cecilia Pellegrini por haberme acompañado en cada etapa, desde el muestreo hasta la escritura de esta tesis, brindándome su tiempo, su cariño y su casa.
- A mi codirector Gustavo Orioli por corregir el manuscrito con gran dedicación, respeto y sabiduría.
- A Elian Tourn por formar parte de los muestreos y estar siempre para cualquier consejo o ayuda que le pedí.
- A Cooperativa Apícola Pampero por el apoyo económico en los viajes realizados.
- A Gonzalo Del Prado y Nicolás Szawarski por ayudarme en los muestreos a campo.
- A las empresas multiplicadoras de semilla que me permitieron realizar los ensayos en sus dependencias.
- A Ana Andrada por asistirme en los análisis palinológicos y por iniciarme en este tema que me apasiona.
- Al Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA), especialmente a su directora Liliana Gallez, por facilitarme el lugar y el material para procesar las muestras colectadas en la tesis y, además, por hacerme parte de un hermoso grupo de trabajo donde me siento valorada y querida.
- A mis compañeras del LabEA, Soledad Villamil y Leticia Fernandez, por creer en mí y estar siempre.
- Al Laboratorio de Análisis Químicos de Suelos por realizar los análisis de Nitrógeno en polen.
- A Antonio Garayalde por la prestancia y calidez con que me ayudó en los análisis estadísticos.
- Al Departamento de Agronomía de la UNS por su invaluable aporte a mi formación y por brindarme las instancias para realizar muchas de las actividades desarrolladas en esta tesis.
- A mis amigos Facundo Daddario, Mariela Ambrosino, Selva Cuppari y Micaela Comezaña, por las horas de cursos compartidos, charlas y consejos. Sin su apoyo no hubiera llegado hasta acá.
- A mi familia que está siempre presente en cada uno de mis logros.
- A mis abuelos, mi gran ejemplo e inspiración.
- A la educación pública por hacerme quien soy.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	6
1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
1.1 Reseña histórica del girasol como cultivo	8
1.2 Biología reproductiva de la especie	10
1.3 La polinización en la producción de semilla híbrida de girasol	13
1.4 Hipótesis y Objetivos	15
2. CAPÍTULO 2: MATERIAL VEGETAL Y ÁREAS DE ESTUDIO	16
2.1 Lotes de producción en Coronel Pringles.....	17
2.1.1 Primera campaña de muestreo.....	17
2.1.2 Segunda campaña de muestreo	19
2.2 Lotes de producción en Villalonga	19
2.2.1 Tercera campaña de muestreo	20
2.2.2 Muestreo complementario.....	20
2.3 Estudios realizados en Bahía Blanca	21
2.4 Caracterización edafoclimática de los sitios de muestreo	21
3. CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE NÉCTAR.....	25
3.1 Introducción	25
3.2 Objetivos específicos	30
3.3 Estudios a campo	30
3.3.1 Materiales y métodos.....	30
3.3.2 Resultados y discusión	32
3.3.2.1 Flores secretoras	32
3.3.2.2 Néctar total secretado.....	33
3.3.2.3 Néctar secretado por flor	34
3.3.2.4 Contenido de azúcar total y contenido de azúcar por flor.....	34
3.3.2.5 Concentración de azúcar del néctar.....	35
3.3.2.6 Análisis de la variabilidad aportada por los factores.....	36
3.3.2.7 Relación entre los parámetros estudiados	37
3.4 Estudios en invernáculo	39
3.4.1 Materiales y métodos.....	39
3.4.2 Caracterización de la secreción	40
3.4.2.1 Distribución de la secreción	41
3.4.3 Resultados y discusión	42

3.4.3.1	Caracterización de la secreción	42
3.4.3.2	Distribución de la secreción	45
3.5	Conclusiones	50
4.	CAPÍTULO 4: ESTUDIOS DEL POLEN	51
4.1	Introducción	51
4.2	Objetivos específicos	56
4.3	Estudios del polen floral	57
4.3.1	Producción intracápítulo de granos de polen/flor	57
4.3.1.1	Materiales y métodos.....	57
4.3.1.2	Resultados y discusión	58
4.3.2	Germinabilidad del polen	60
4.3.2.1	Materiales y métodos.....	60
4.3.2.2	Resultados y discusión	62
4.4	Estudios del polen corbicular	65
4.4.1	Origen botánico de las cargas colectadas.....	65
4.4.1.1	Materiales y métodos.....	65
4.4.1.2	Resultados y discusión	67
4.4.2	Caracterización de las cargas de Girasol.....	70
4.4.2.1	Materiales y métodos.....	70
4.4.2.2	Resultados y discusión	71
4.4.3	Contenido nutricional de las cargas colectadas	72
4.4.3.1	Materiales y métodos.....	72
4.4.3.2	Resultados y discusión	73
4.5	Conclusiones	74
5.	CAPÍTULO 5: ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LAS FLORES	75
5.1	Introducción	75
5.2	Objetivos específicos	78
5.3	Características del capítulo y flores liguladas.....	78
5.3.1	Materiales y métodos.....	78
5.3.2	Resultados y discusión	79
5.3.2.1	Diámetro del receptáculo	79
5.3.2.2	Características de las flores liguladas.....	81
5.4	Características de las flores tubulosas.....	85
5.4.1	Materiales y métodos.....	85
5.4.2	Resultados y discusión	87
5.4.2.1	Ancho de corola.....	88
5.4.2.2	Largo de corola.....	89

5.4.2.3	Largo del estilo	91
5.4.2.4	Volumen de los nectarios.....	93
5.5	Integración de las variables morfométricas de los materiales genéticos	98
5.6	Conclusiones	100
6.	CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE LAS VISITAS	102
6.1	Introducción	102
6.2	Objetivos específicos	106
6.3	Materiales y métodos.....	106
6.4	Resultados y discusión	107
6.4.1	Dinámica diaria de visitas	107
6.4.2	Análisis de la frecuencia de visitas entre genotipos y tratamientos	109
6.5	Conclusiones	113
7.	CAPÍTULO 7: ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO	114
7.1	Introducción	114
7.2	Objetivos específicos	116
7.3	Materiales y métodos.....	116
7.4	Resultados y discusión	118
7.5	Conclusión.....	121
8.	CAPÍTULO 8: CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	122
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	126

RESUMEN

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los principales cultivos anuales utilizados para la extracción de aceite en el mundo y la Argentina se destaca por ser un importante productor y exportador de semilla híbrida. En este tipo de producción es esencial que el polen sea transportado desde las líneas androfértiles (machos), restauradoras de la fertilidad, a las androestériles (hembras), siendo la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) la que adquiere un rol fundamental como uno de los principales polinizadores. En este contexto, adquieren gran importancia las recompensas florales del girasol, tanto las primarias (polen y néctar) como las secundarias (señales visuales de las flores liguladas de los capítulos) que definirán la atractividad de las líneas parentales. Éstas podrían dirigir el movimiento que las abejas realizan en el cultivo con consecuencias directas sobre la eficiencia de polinización, y, en última instancia, en los rendimientos obtenidos. En este trabajo se estudiaron las recompensas florales primarias y secundarias de distintos genotipos parentales de girasol en sistemas de producción de semilla híbrida para definir la atractividad de cada material, interpretar las preferencias de *Apis mellifera* en presencia de flora melífera competitiva y evaluar el efecto de esta interacción en la producción de semilla híbrida.

Para esto, se realizaron estudios en plantas obtenidas de lotes de producción de semilla híbrida de girasol en establecimientos rurales del sur bonaerense: dos lotes de producción en Coronel Pringles y uno en Villalonga. Otra parte del trabajo se realizó en gabinete y en laboratorio, en dependencias de Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur. Allí se procesaron muestras de material vegetal tomadas y conservadas en dichos lotes, así como también se trabajó con plantas de varios de los genotipos estudiados obtenidas en invernáculo y en parcelas experimentales. El material vegetal consistió en ocho líneas parentales: un sistema con tres genotipos tradicionales (dos hembras que compartían el macho restaurador), otro con los mismos genotipos con tecnología de resistencia a herbicidas Clearfield y el último formado por dos genotipos alto oleico (una hembra y un macho).

Respecto al estudio del néctar, los resultados mostraron una secreción diferencial en los distintos genotipos estudiados. Las diferencias en los parámetros asociados a la cantidad de secreción no fueron condicionadas por el evento tecnológico que fue introducido por mejoramiento genético de los parentales ni al sexo de los mismos. El néctar total secretado por las líneas estudiadas resultó de un balance entre la cantidad de flores secretoras y la cantidad de néctar que secretó cada flor, siendo esta relación diferente en los distintos genotipos analizados. La comparación entre los genotipos mostró que, a menor cantidad de secreción fue mayor su concentración, relación que se confirmó en el análisis multivariado a través de una correlación significativa y negativa entre estos parámetros. Los parámetros

asociados a la cantidad de esta recompensa estuvieron más relacionados al componente genético que al ambiental (día de muestreo) mientras que, en los vinculados a la cantidad de azúcar, esta relación se dio a la inversa. La relación entre los genotipos respecto a la cantidad de néctar secretado se mantuvo en condiciones de campo e invernáculo, mostrando una fuerte influencia del factor genético. La distribución de las flores secretoras dentro del capítulo resultó, aleatoria en los tres genotipos estudiados, siendo la misma independiente del estadio de floración en que se encontraban las inflorescencias y del sector muestreado.

Los tres parentales machos estudiados presentaron una producción diferente de granos de polen por flor en los distintos sectores del capítulo (interno, medio y externo) sin que pudiera establecerse un patrón común en los tres materiales. La estabilidad respecto a la producción polínica en distintos años y sitios de muestreo permite inferir una fuerte influencia del factor genético por sobre el ambiental. Si bien la germinabilidad del polen mostró tener cierta vulnerabilidad con las características climáticas (principalmente las asociadas a la temperatura), la misma se mantiene estable a lo largo del día. Este estudio demostró, a través de los cambios en la frecuencia de cargas corbiculares de girasol colectadas ante distintos recursos polínicos disponibles en distintos planteos productivos, el pecoreo selectivo que realizan las abejas sobre las especies en floración. Esta selectividad, fundada en la baja calidad nutricional del polen de girasol, demandaría un manejo agronómico que también satisfaga los requerimientos de las abejas con otros recursos florales.

En los tres sistemas de producción estudiados, las líneas masculinas presentaron menor diámetro de los capítulos y área de las flores liguladas que las líneas femeninas. Esto genera una diferencia visual manifiesta entre las líneas de siembra de cada parental que pudo influir en el movimiento de los polinizadores en los lotes de producción. En este trabajo se encontraron diferencias entre los genotipos en la cantidad, tamaño y aspecto de las flores liguladas, así como el largo de corola y estilo en las flores tubulosas y el volumen de los nectarios. Las primeras características están relacionadas a la atraktividad a larga distancia mientras que las otras, por ser de proximidad, inciden en la eficiencia de pecoreo y polinización.

El efecto de la presencia/ausencia y la morfología de las flores liguladas generaron una respuesta diferencial en las visitas de los polinizadores, principalmente en *A. mellifera*, poniendo así de manifiesto las diferencias de atraktividad de los genotipos. Si bien las recompensas, ya sean primarias o secundarias, operan en conjunto, los distintos ensayos llevados a cabo en esta tesis permitieron interpretar cuáles serían las más influyentes. La diferencia entre las visitas registradas en los capítulos con y sin flores liguladas dejó en evidencia que estas estructuras son un componente fundamental que incide en la

atractividad de los genotipos y ello se verificó en 7 de los 8 materiales genéticos estudiados. Por su parte, la comparación entre capítulos sin flores liguladas entre parentales androestériles, es decir, que carecían de las recompensas visuales y de polen, no mostró una tendencia clara en la frecuencia de visitas que informe sobre un efecto determinante de la secreción de néctar. Tampoco se observó una diferencia notable en las visitas entre las hembras y machos, indicando que el aporte de polen como recompensa alimenticia no sería un factor que defina la atractividad de las líneas.

Finalmente, la frecuencia de visitas registrada mostró una correspondencia con los rendimientos y calibres obtenidos, demostrando el beneficio económico de la polinización en un sistema de producción de semilla híbrida.

En la mayoría de las variables medidas en esta tesis, las diferencias encontradas entre las comparaciones estadísticas no involucraron las mejoras tecnológicas con las que contaban las líneas. Sería fundamental profundizar estos estudios en otros materiales con resistencia a herbicidas y mayor contenido de ácidos grasos saturados para reforzar estos conceptos.

Conocer y comprender la relación entre la biología floral del girasol y la actividad de los polinizadores basada en sus necesidades y capacidades es fundamental para realizar un manejo más sustentable del sistema productivo que favorezca las relaciones biológicas de los protagonistas que lo sostienen. Reconsiderar a la flora competitiva del cultivo como complementaria para las necesidades alimenticias de *Apis mellifera*, podría ser beneficioso para asegurar la actividad de los polinizadores. Este conocimiento, aplicado a programas de mejoramiento y estrategias de manejo agronómico, determinará mejoras en el rendimiento y calidad de la producción.

ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the main annual crops used for oil extraction in the world and Argentina stands out for being an important producer and supplier of hybrid seed. In this type of production, it is essential that the pollen be transported from male-fertile lines (males) to male-sterile lines (females) and the honey bee (*Apis mellifera* L.) plays a fundamental role as one of the main pollinators. In this context, the floral rewards of the crop acquire great significance, both the primary (pollen and nectar) and the secondary ones (visual signals of the ligulate flowers of the capitula) that will define the attractiveness of the parental lines. These could lead the movement of bees within the crop with direct consequences on pollination efficiency and ultimately on yields obtained. In this work, the primary and secondary floral rewards of different sunflower parent genotypes in hybrid seed production systems were studied to define the attractiveness of each genetic material, interpret the preferences of *Apis*

mellifera in the presence of competitive honey flora, and evaluate the effect of this interaction in hybrid seed production.

Studies were carried out on plants obtained from hybrid sunflower seed production fields in southern Buenos Aires: two production plots in Coronel Pringles and another in Villalonga. Laboratory work was performed at the facilities of the Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur where samples of plant material collected and preserved were processed. There, plants of several of the studied genotypes were also grown in the greenhouse and in the experimental field. The plant material consisted of eight sunflower parental lines: one system of three traditional genotypes (two female lines and the same male restoring line for both), another system of the same three lines with Clearfield herbicide resistance technology and the last one, composed by two high oleic genotypes (male and female lines).

The results of nectar study showed differential secretion in the studied genotypes. The differences in the parameters associated with the amount of secretion were not conditioned by the technological event introduced by genetic improvement of the parents or their sex. The total nectar secreted by every line was the result of a balance between the amount of secreting flowers and the volumen of nectar secreted by each flower, this relationship being different in the genotypes analyzed. The comparison between the genotypes showed that, the lower amount of nectar secretion, the higher the nectar concentration, relationship confirmed in the multivariate analysis through a significant and negative correlation between these parameters. Parameters associated with the amount of this reward were more related to the genetic component than to the environmental one (sampling day), while in those linked to the amount of sugar, this relationship was inverse. The relationship between genotypes regarding the amount of nectar secreted was maintained under field and greenhouse conditions, showing a strong influence of the genetic factor. The distribution of the secretory flowers was random within the capitulum in the three studied genotypes, regardless of the floral stage or the sampled sector of the inflorescence.

The three male parents showed different pollen grain production per flower in the different sectors of the capitulum and it was not possible to establish a common pattern in the three genotypes. The stability of pollen production among different years and sampling sites allows inferring a strong influence of the genetic factor over the environmental one. Even pollen germinability showed some vulnerability to climatic characteristics (mainly those associated with temperature), it remained stable throughout the day. This study verified, by means of changes in the frequency of sunflower corbicular loads collected within available pollen resources in the different agronomic management of systems, the selective forage of bees on the species in bloom. This selectivity, based on the low nutritional quality of

sunflower pollen, would demand an agronomic management that also satisfies the requirements of bees with other floral resources.

In the three studied production systems, the male lines showed smaller diameter of the capitula and area of the ray florets than the female ones. This generates a clear visual difference between the planting lines of each parent that could influence the movement of pollinators in the production plots. Differences were found between the genotypes in the number, size and appearance of the ligulate flowers, as well as the length of the corollas and styles in the tubular ones, and the volume of the nectaries. The former traits are related to long-distance attractiveness, while the latter, strongly related to proximity, affect the efficiency of foraging and pollination.

The effect of the presence/absence and the morphology of the ligulate flowers generated a differential response in the visits of pollinators, mainly in *A. mellifera*, thus revealing the differences in the attractiveness of the genotypes. Although the rewards (primary or secondary) operate together, the different tests performed in this thesis allowed to interpret which ones would be the most influential. The difference between the visits recorded in the capitula with and without ligulate flowers showed that these structures are a fundamental component that affects the attractiveness of the genotypes; this was verified in 7 of the 8 genetic materials studied. Comparison of flower heads without ligulate flowers between male-sterile parents, lacking visual and pollen rewards, did not show a clear trend in the frequency of visits that would inform about a relevant effect of nectar secretion. There was also no notable difference in visits between females and males, indicating that the pollen supply as a food reward would not be a factor defining the attractiveness of the lines.

Finally, the frequency of visits recorded showed a correspondence with the yields and seed size obtained, validating the economic benefit of pollination in a hybrid seed production system.

For most of the variables measured in this thesis, the differences found through statistical comparisons did not involve the technological improvements that the lines had. It would be essential to deepen these studies in other genotypes with herbicide resistance and higher content of saturated fatty acids to reinforce these concepts.

Knowing and understanding the relationship between the floral biology of sunflower and the activity of pollinators according to their needs and capacities is essential to carry out a more sustainable management of the system that favors the biological relationships of the main actors that sustain it. Reconsidering the crop's competitive flora as complementary in terms of nutritional requirements of *Apis mellifera* could be favorable to ensure pollinator activity. This knowledge, applied to breeding programs and agronomic management strategies, will determine improvements in yield and production quality.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AC: Ancho de corola

AO: Alto oleico

AT: Amplitud térmica

CAF: Contenido de azúcar por flor

CAP: Cámara de Apicultores Pampero Limitada

CAT: Contenido de azúcar total

CCA: Código Alimentario Argentino

CL: Clearfield

CM: Cargas corbiculares del lote tradicional

CMAO: Cargas corbiculares del lote Alto oleico

CMCL: Cargas corbiculares del lote Clearfield

CN: Concentración del néctar

DR: Diámetro del receptáculo

EF: Estadio floral

GP: Germinabilidad del polen

GPF: Granos de polen por flor

H1: Parental androestéril tradicional 1

H1CL: Parental androestéril Clearfield 1

H2: Parental androestéril tradicional 2

H2CL: Parental androestéril Clearfield 2

H2CL₂₀₁₅: Parental androestéril Clearfield 2 muestreado en 2015

HAO: Parental androestéril Alto oleico

HR: Humedad relativa media

HR_{máx}: Humedad relativa máxima

HR_{mín}: Humedad relativa mínima

LabEA: Laboratorio de Estudios Apícolas, Depto. de Agronomía – UNS – CIC

LC: Largo de corola

LE: Largo de estigma

M: Parental androfértil tradicional

MAO: Parental androfértil Alto oleico

MCL: Parental androfértil Clearfield

MCL₂₀₁₅: Parental androfértil Clearfield, muestreado en 2015

MEB: microscopía electrónica de barrido

NFL: Número de flores liguladas

NP: Néctar promedio

NPS: Néctar promedio secretoras

NSF: Néctar secretado por flor

NTS: Néctar total secretado

P1000: Peso de mil granos

PB: Proteína bruta

PFS: Porcentaje de flores secretoras

Pns: Probabilidad de que una flor no secretora presente una flor secretora vecina

Ps: Probabilidad de que una flor secretora presente una flor secretora vecina

Rto planta⁻¹: Rendimiento por planta

SE: Sector externo del capítulo

SI: Sector interno del capítulo

SM: Sector medio del capítulo

T: Tradicional

T°: temperatura media

T°máx: temperatura máxima

T°mín: temperatura mínima

VEN: Volumen estimado del nectario

VIRC: Valle Bonaerense del Río Colorado

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los principales cultivos anuales utilizados para la extracción de aceite en el mundo. Para esta especie, el contenido graso de su semilla es el que contribuye, casi excluyentemente, a la formación de su precio mientras que el resto, principalmente harina de proteína vegetal, se vende como insumo forrajero para la producción de carnes y leche (Haucke, 2009). La incorporación del girasol en los mercados de la alimentación humana, la producción de aceites y derivados y la alimentación animal, lo han convertido en un cultivo muy importante desde el punto de vista económico, no sólo en la Argentina sino para todo el mundo.

1.1 RESEÑA HISTÓRICA DEL GIRASOL COMO CULTIVO

El girasol es una especie anual originaria del continente americano, específicamente del centro y norte de México y sudoeste de los Estados Unidos, aunque también se lo encuentra asilvestrado en Canadá, Ecuador, Colombia y Perú. Los españoles lo conocieron en México y Perú durante la época de la conquista. Fueron los ingleses y franceses quienes lo recolectaron en América del Norte y lo llevaron a sus respectivos países. Inicialmente, fue cultivado en Europa como ornamental y recién en 1812 se reporta su uso con fines industriales en la producción de aceite (Ávila, 2009).

En Argentina, las primeras introducciones de semillas se remontan al siglo XIX por los colonos de origen hebreo afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires. Su difusión como cultivo, a partir del año 1900, comienza en la Colonia Mauricio (Carlos Casares, Provincia de Buenos Aires) y en Basavilvaso (Provincia de Entre Ríos) por agricultores inmigrantes (Ingaramo y Feoli, 2008).

Desde 1930 hasta 1959, el girasol experimentó una gran expansión como cultivo oleaginoso. Luego de una etapa de crisis causada por factores económicos y sanitarios entre los años 1950 y 1960, comenzó la carrera del mejoramiento que, inicialmente, se basó en el desarrollo de variedades por parte del INTA. El descubrimiento de la androesterilidad genética (Leclercq, 1969) y la androesterilidad citoplásmica (Kinman, 1970) hicieron posible la producción y difusión de los primeros híbridos a escala comercial, dando lugar, a partir de 1975, a un vertiginoso desarrollo de nuevos materiales (Ingaramo y Feoli, 2008). Sin duda, este aporte al mejoramiento fue el más importante en la historia del cultivo, pero no el único. Las tecnologías relacionadas al tipo de lípidos de reserva del grano y la resistencia a herbicidas fueron otras de las mejoras que aumentaron la competitividad de esta oleaginosa.

En los cultivos convencionales de girasol el 40-55% del peso del grano corresponde a aceite, del cual un 10% son ácidos grasos saturados y un 90% insaturados. Estos últimos incluyen un 15-35% de ácido oleico (monoinsaturado) y un 75-55% de linoleico

(polinsaturado con dos dobles enlaces). El balance entre estos tipos de ácidos grasos define la aptitud industrial de los aceites de girasol ya que determina la tolerancia a altas temperaturas durante periodos prolongados y puede evitar los perjuicios ocasionados por los aceites hidrogenados (Franco, 2013). Si bien en los materiales con modificaciones genéticas, el porcentaje de ácido oleico puede alcanzar valores de 80-85%, el Código Alimentario Argentino (CAA) define al aceite de girasol como alto oleico (AO) cuando el contenido de este ácido graso es igual o mayor al 75%. Cabe esperar que las variedades o híbridos mencionados contengan una menor proporción de linoleico, dado que la suma de ambos suele ser constante (Matteo, 2014).

El desarrollo de materiales AO surgió en 1976 a partir de la mutación en una variedad en la cual, luego de sucesivas selecciones, se obtuvieron plantas que alcanzaron más del 50% de oleico. Esta mutación fue empleada por muchos mejoradores para la creación de los híbridos AO que se cultivan actualmente en respuesta a una demanda de origen industrial relacionada a las cualidades de los ácidos grasos insaturados.

Por otro lado, el rasgo de resistencia a herbicidas (materiales Clearfield – CL) se introdujo en líneas endogámicas de girasol en 2003 mediante métodos de reproducción convencionales con el fin de desarrollar cultivares resistentes a Imidazolinonas y Sulfonilureas. Las poblaciones de girasol silvestre de las cuales surgieron estas mejoras tecnológicas fueron descubiertas en 1996 en Kansas, en campos tratados durante varios años con dichos herbicidas (Al-Khatib, 1998). Luego, se observó resistencia cruzada en poblaciones de girasol silvestre pertenecientes a los estados de Dakota del Sur (White et al., 2002) y Kansas (Baumgartner et al., 1999b).

A partir de 2010, se dispuso del paquete CL Plus, fruto de un desarrollo conjunto de Nidera y BASF. Esta tecnología, desarrollada sobre girasoles cultivados, presenta un gen que permite obtener materiales con mayor potencial de rendimiento y mayor contenido de aceite. Además, viene acompañado con la posibilidad de la utilización de un nuevo herbicida que reemplaza al Clearsol, manteniendo el mismo control de malezas (Bertello, 2010). Actualmente, la mayoría de los genotipos sembrados tienen este tipo de resistencia CL, incluso combinada con AO.

La producción de girasol en Argentina muestra dos etapas claras con las campañas 1999-2000 como punto de inflexión. La primera etapa presentó un importante ascenso gracias a las mejoras genéticas y tecnológicas mencionadas, lo que derivó en un pico de producción de 7 M t en la cosecha de 1999. La segunda etapa, en la cual nos encontramos actualmente, comenzó con el desplazamiento del cultivo a zonas más marginales y con niveles de producción que fluctúan en función de las condiciones climáticas, aunque mantienen los volúmenes en alrededor de 3 M t (MAGyP, 2021).

Nuestro país se destaca por ser un importante productor y exportador de semilla híbrida de girasol. Entre 2010 y 2018, esta producción promedió las 3.000 t posicionando al país tercero a nivel mundial, aunque muy lejos en volumen de Ucrania y Rusia, que se encuentran en el primer y segundo lugar, respectivamente, en este rubro (FAO, 2021). Si bien esta actividad no se ha incrementado en los últimos años, se mantiene estable y genera puestos de trabajo en los distintos eslabones que componen esta cadena de valor, desde la primera etapa de mejoramiento y biotecnología, luego la multiplicación y producción, el procesamiento y acondicionamiento de la semilla, culminando en la comercialización y distribución (MinCyT, 2016).

La producción nacional en este rubro está sustentada por una fuerte industria semillera, con más de 20 empresas que tienen en Argentina sus programas de mejoramiento genético y sus centros de biotecnología y producción.

1.2 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA ESPECIE

El girasol híbrido cultivado presenta típicamente un tallo no ramificado que mide entre 50 cm y 3 m de altura, portador de hojas simples y ásperas. Éste remata en una inflorescencia única llamada capítulo, vulgarmente denominada “cabeza”, y es el órgano de cosecha, ya que en ella se desarrollan los granos. Esta inflorescencia consta de una superficie más o menos aplanada, llamada receptáculo común, sobre la que se insertan numerosas flores pequeñas y epíginas. Externamente se encuentra rodeada por brácteas o filarias, que cumplen la función de protección cuando el capítulo permanece cerrado.

Los dos tipos de flores que se desarrollan sobre el receptáculo común del girasol se denominan liguladas y tubulosas, según la morfología de sus corolas (Figura 1.1). Debido a la presencia de ambos tipos de flores, se dice que el capítulo es radiado.

Las flores liguladas presentan una corola formada por la unión de 5 pétalos alargados que le dan un aspecto de lengüeta. Su color varía del amarillo al rojizo. Generalmente son estériles ya que presentan un pistilo rudimentario y no presentan anteras. Estas flores, que se ubican en la periferia del receptáculo formando un anillo simple, tienen la capacidad de absorber y reflejar luz UV por lo que estarían asociadas a funciones de atracción de polinizadores (Sammataro, 1986).

Las flores tubulosas, cuyo número varía entre 700 a 3000 en híbridos que producen aceite y, hasta 8000 en híbridos como los confiteros, se desarrollan en toda la superficie del receptáculo común. Se disponen en arcos radiales llamados parásticas de contacto que pueden contarse en sentido horario/antihorario. El número de parásticas sigue la serie de Fibonacci: 89/144 en capítulos pequeños o 144/233 en capítulos grandes.

Las flores del disco poseen 5 pétalos unidos entre sí formando una corola tubular que se desarrolla por encima del ovario. Por dentro del tubo corolino, se encuentra el estilo cuyo

extremo apical se divide en dos ramas tapizadas internamente por tejido *estigmático*. Entre el tubo de la corola y el estilo, se encuentra otro tubo formado por los *estambres* sinantéreos (unidos entre sí por las anteras). El ovario, que es ínfero, presenta en su porción apical un nectario anular que rodea la base del estilo (Bernardello, 2007). Las dos hojas carpelares, unidas por sus márgenes, alojan en su interior un sólo óvulo que originará la semilla. El fruto resultante es una cipsela, la que es utilizada como simiente en el cultivo de esta especie.

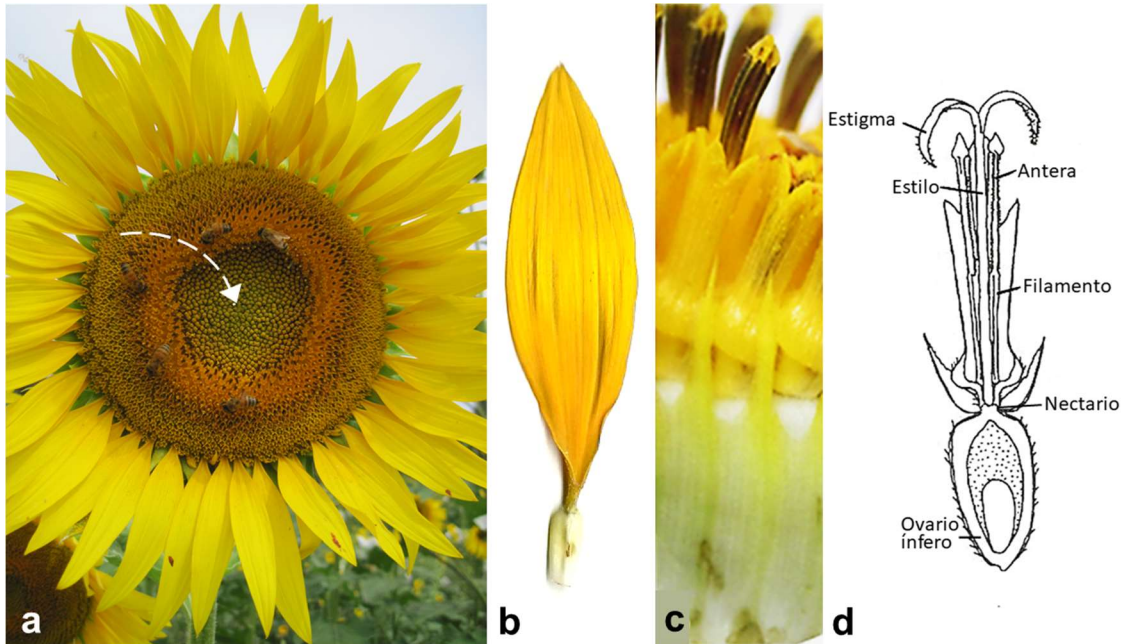


Figura 1.1: a). Capítulo de girasol. La flecha indica el sentido de antesis de las flores del disco. b) Flor ligulada c) Flor tubulosa, d) Esquema de flor tubulosa (modificado de Seiler, 1997)

En el girasol, a pesar de que las flores tubulosas son hermafroditas, la madurez sexual no ocurre simultáneamente en los órganos reproductivos, sino que presentan proterandria, es decir, que cada flor pasa primero por un estadio de fertilidad masculina y posteriormente, femenina (Schneiter, 1997).

El estudio de la biología floral de esta especie (Putt, 1940) muestra que, en un pimpollo próximo a la antesis, temprano en la mañana (alrededor de las 6:00 a.m. en días cálidos y soleados), los filamentos de los estambres rápidamente se estiran y elevan a las anteras sobrepasando el nivel del tubo de la corola. Inmediatamente después, éstas se abren por su extremo apical y liberan el polen, encontrándose así la flor en su fase masculina fértil. Luego, la porción basal del estilo se elonga y empuja hacia arriba a las dos ramas apicales, que están juntas y tienen aún sus superficies receptoras estigmáticas en contacto, a través del tubo de las anteras. Así, el estilo en crecimiento empuja la masa de polen hacia arriba para ponerlo al alcance de los insectos (presentación secundaria). En ese momento el pistilo aún no es receptivo. Recién entre las 5:00 p.m. y la mañana siguiente, las ramas del estilo se separan y exponen sus superficies receptoras estigmáticas. Para entonces, las

anteras descendieron al interior de la corola debido a la pérdida de turgencia de los filamentos, contribuyendo así a la exposición de las áreas estigmáticas receptoras. En ese momento la flor alcanza su fase femenina fértil y es cuando puede ocurrir la polinización y fertilización. Entonces, cada flor pasa por sus etapas sexuales fértiles en distintos momentos de su vida la que, en total, dura entre 24 y 30 horas, aproximadamente (Figura 1.2 a). Una vez fertilizado el óvulo, las ramas del estigma se marchitan. Este fenómeno de dicogamia típico de las Asteráceas, sumado a los distintos grados de autoincompatibilidad que pueden presentar los genotipos de girasol, son mecanismos evolutivos para evitar la autofecundación.

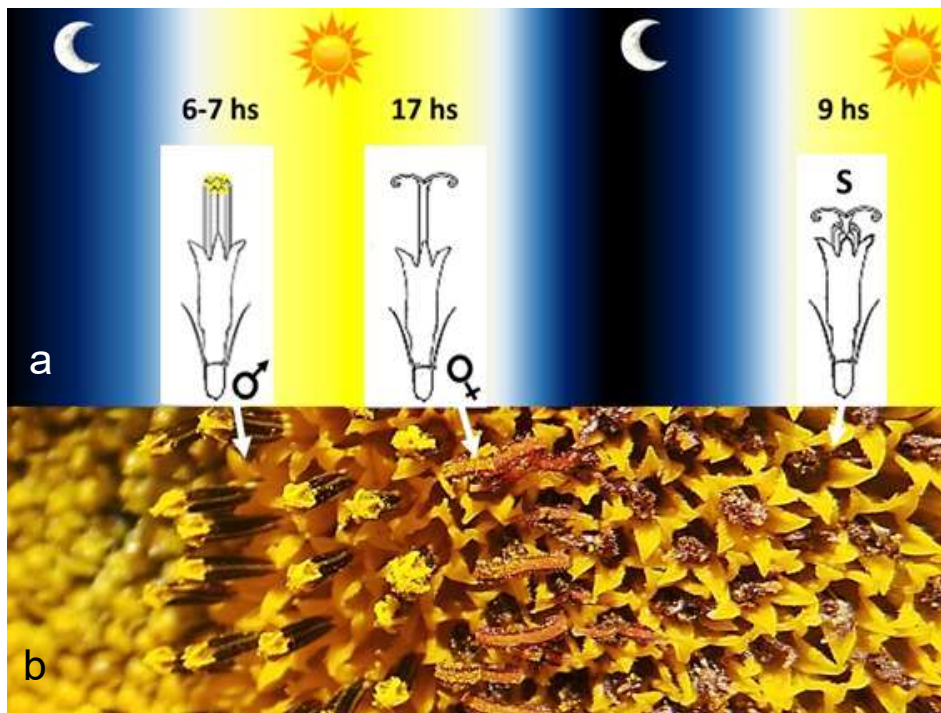


Figura 1.2: Esquema del ciclo de vida de una flor tubulosa y hermafrodita de girasol. a) Horarios del día en que se presentan los estadios femenino, masculino y senescente (S). b) Ubicación dentro del disco del capítulo de las flores en los estadios mencionados.

Como ocurre en todos los capítulos, la secuencia de antesis es centrípeta (Figura 1.1 a). El anillo externo de flores tubulosas abre al mismo tiempo que las flores liguladas, que se encuentran plegadas contra los pimpollos en el borde del capítulo, estadio floral (EF) 5 definido por Schneiter y Miller (1981). Luego abren las de adentro a un ritmo de 1 a 4 anillos de flores tubulosas por día. Así, se genera una sucesión donde las flores más externas son más antiguas que las internas. El proceso completo de antesis en un capítulo dura entre 5 y 10 días y varía con el tamaño del receptáculo y con las condiciones atmosféricas (temperatura y radiación, especialmente). Durante todo ese tiempo, coexisten en cada capítulo, flores en diferentes etapas sexuales fértiles, así como con un desarrollo reproductivo escalonado (Figura 1.2 b).

1.3 LA POLINIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA HÍBRIDA DE GIRASOL

La polinización, entendida como la transferencia de polen desde los órganos masculinos a los femeninos de la misma u otra flor, es un proceso esencial para el mantenimiento de la viabilidad y la diversidad genética de las plantas, además de mejorar la calidad y cantidad de semillas y frutos (Richards, 2001; Chautá-Mellizo et al., 2012; Garibaldi et al., 2014). El 87% de las especies cultivadas, que representan un 35% del suministro global de alimentos, dependen de este proceso (Hoehn et al.; 2008; Klatt et al., 2014; Mallinger y Gratton, 2015). Por otra parte, se estima que, dentro del 90% de la polinización que ocurre en plantas con flor en todo el mundo, un 67% es llevado a cabo por insectos, constituyéndose como el grupo de polinizadores más importante (Bonilla, 2012; Fründ et al., 2013). El papel de estos vectores, fundamentalmente el de las abejas, ha sido ampliamente demostrado para todo tipo de cultivos (Kakutani et al., 1993; Monzón et al., 2004; Chambó et al., 2011; Rader et al., 2013; García et al., 2016), aunque cada vez es mayor la preocupación por la pérdida de estos organismos y de los servicios ecosistémicos que proveen (Ghazoul, 2005; Kremen et al., 2007; Aizen et al., 2009; Garibaldi et al., 2011, 2014).

A diferencia de los cereales como el sorgo o el maíz, que son polinizados por el viento, en el cultivo del girasol los polinizadores juegan un papel central para que la fecundación y la formación de la semilla ocurra (de Estrada et al., 2012). El girasol es una especie de polinización entomófila y ello se verifica en las características de su polen (Putt, 1940) que tiene presentación secundaria, estructura equinada y presencia de pollenkitt (Schneiter, 1997).

Las características del sistema de producción de semilla híbrida definen la esencialidad de que el polen sea transportado desde las líneas androfértiles (machos) a las androestériles (hembras). En este contexto, la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) adquiere un rol fundamental como uno de los principales polinizadores (Torreta et al., 2010) dando lugar a una relación mutualista donde ambas especies obtienen su beneficio.

En la producción de semilla híbrida, la productividad femenina, la producción de polen y el manejo de la sincronía de la antesis floral entre líneas parentales son aspectos de gran importancia para maximizar los rindes. La abundante oferta de polen se logra mediante la siembra alternada de surcos de machos y hembras, en proporciones estudiadas previamente para cada material. Se suelen utilizar proporciones de 10:3, es decir, 10 hileras de líneas hembras y 3 de machos; aunque en la zona del Valle Bonaerense del Río Colorado (VIRC), una de las áreas más dedicadas a esta producción, la relación baja hasta 6:2, según las empresas y las líneas progenitoras (Figura 1.3). Por otro lado, la sincronización de las floraciones de las líneas androestériles y androfértiles, se obtiene realizando siembras desfasadas o diferidas (Split de siembra) de cada línea. Por ejemplo, primero se siembran

los 2 surcos del macho, y al 60% de su emergencia se siembra la hembra. En algunas oportunidades la siembra se puede realizar hasta en tres etapas (Lorenzatti, 2008).

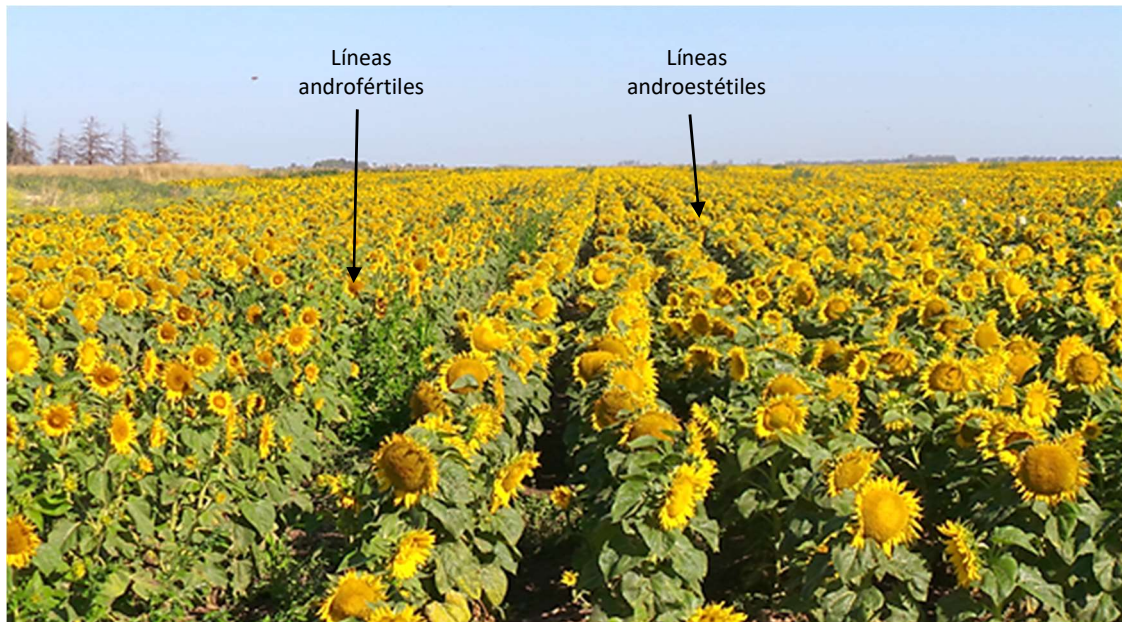


Figura 1.3: Distribución de líneas androestétils y androfértiles en un sistema de producción de semilla híbrida de girasol.

Para asegurar la pureza genética de la semilla híbrida es necesario aislar los lotes de producción, de manera de excluir cualquier fuente de polen contaminante. Para ello, se realizan aislamientos de entre 1300 a 1500 m alrededor del lote eliminando, incluso, la vegetación espontánea de las banquinas ya que se la considera flora competitiva por distraer la atención de las abejas (Lorenzatti, 2008).

La *atractividad* de las líneas parentales de girasol juega entonces un rol fundamental para dirigir el movimiento que las abejas realizan en el cultivo, lo que tiene consecuencias directas sobre la eficiencia de polinización, y en última instancia, en los rendimientos obtenidos.

En este contexto, adquiere gran importancia el concepto de *recompensa* o *recurso floral*, definido por Simpson y Neff (1981) como todo lo producido por la flor, o los componentes de inflorescencias, para atraer a los agentes polinizadores, y a causa de ello, asegurar repetidas visitas que conducirán a la polinización.

Las recompensas florales pueden clasificarse como primarias y secundarias, incluyendo las primeras a todos los productos de origen vegetal que los polinizadores obtienen al visitar sus estructuras reproductivas. Las más importantes son el polen y el néctar, aunque muchas especies vegetales altamente especializadas ofrecen aceites y perfumes en forma de gota a sus polinizadores. Por otro lado, son considerados atractivos secundarios aquellas señales visuales generalmente de las corolas (formas, tamaños, colores, guías UV) u olfativas (compuestos aromáticos producidos en osmóforos), que actúan

como atractivos y/o indicativas de la presencia de una recompensa primaria (Faegri y Van Der Pijl, 1979).

En general, las recompensas florales no son tenidas en cuenta en los programas de mejoramiento de cultivos extensivos entomófilos, por lo que es de esperar que exista mucha variabilidad intra-específica en esos caracteres (Cerrutti y Pontet, 2016). La eficiencia de polinización podría mejorarse identificando y seleccionando rasgos florales que aumenten su atractivo a los polinizadores (Mallinger y Prasika, 2017).

1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: Las recompensas florales difieren entre distintas líneas parentales del girasol definiendo la atractividad para las abejas y brindando información útil para entender el éxito reproductivo del cultivo y mejorar los rindes en sistemas de producción de semilla híbrida.

Objetivos:

1. Estudiar las recompensas florales primarias y secundarias para definir la atractividad de los genotipos parentales en sistemas de producción de semilla híbrida de girasol
2. Interpretar las preferencias de *Apis mellifera* en situación real de producción de semilla híbrida de girasol en presencia de flora melífera competitiva
3. Evaluar el efecto de la atractividad de los genotipos parentales sobre *Apis mellifera* en la producción de semilla híbrida.

CAPÍTULO 2: MATERIAL VEGETAL Y ÁREAS DE ESTUDIO

La mayor parte de los estudios presentados en esta tesis fueron llevados a cabo en situaciones reales de producción de semilla de girasol en establecimientos rurales del sur bonaerense. Otra parte, se realizó en gabinete y en laboratorio, en dependencias del LabEA¹, donde se procesaron muestras de material vegetal tomadas y conservadas en los lotes de producción, así como también se trabajó con plantas obtenidas en invernáculo y en parcelas experimentales en el Departamento de Agronomía de la Universidad nacional del Sur (DA-UNS) (Figura 2.1). Las estructuras muestreadas (capítulos, flores, polen, etc.) y las metodologías con que fueron procesadas, se describen en los capítulos correspondientes. Se utilizó la escala fenológica de Schneiter y Miller (1981) para la clasificación de los EF.

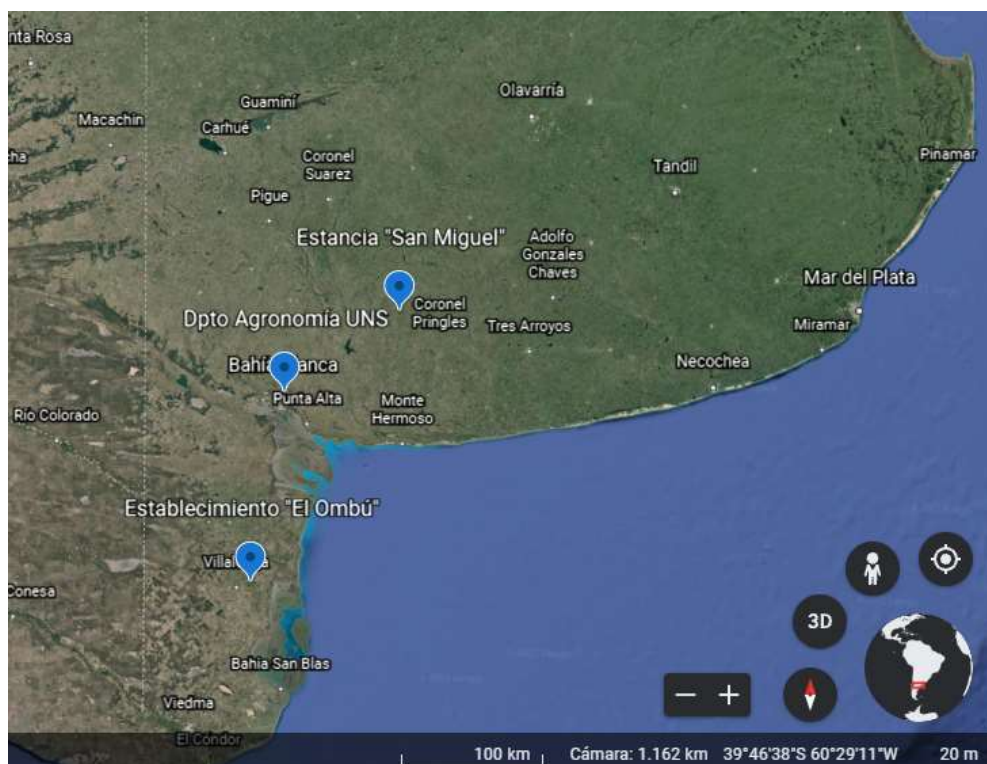


Figura 2.1: Ubicación de los sitios de muestreo en el Sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

La Tabla 2.1 resume los distintos años de muestreo y los materiales genéticos utilizados, lo que facilitará futuras descripciones. Por cuestiones de confidencialidad y en acuerdo con las empresas semilleras que permitieron la toma de muestras de los lotes de producción, se decidió otorgar una nomenclatura de fantasía a los genotipos parentales estudiados. Así, todas las líneas parentales con inicial **H** corresponden a líneas

¹ Laboratorio de Estudios Apícolas, Departamento de Agronomía - Universidad Nacional del Sur - Comisión de Investigaciones Científicas

androestéiles o “hembra”, mientras que la inicial **M** hace referencia a genotipos androfértiles o “machos”.

Tabla 2.1: Campañas de muestreo, ubicación de los lotes y características de los materiales genéticos utilizados. T: Líneas tradicionales; CL: Clearfield y AO: Alto oleico.

Localidad	Sitio	Año	Genotipo		
			Parental	Tecnología	Denominación
Coronel Pringles	Estancia San Miguel	2014	Androestéril 1	T	H1
			Androestéril 2		H2
			Androfértil		M
			Androestéril 1	CL	H1CL
			Androestéril 2		H2CL
			Androfértil		MCL
Villalonga	Establecimiento “El Ombú”	2015	Androestéril	AO	HAO
	Lote TecnoSeeds		Androfértil		MAO
			Androestéril 2	CL	H2CL ₂₀₁₅
			Androfértil		MCL ₂₀₁₅
Bahía Blanca	Predio Agronomía, UNS.	2016	Androestéril 1	CL	H1CL
			Androestéril 2		H2CL
			Androfértil		MCL

2.1 LOTES DE PRODUCCIÓN EN CORONEL PRINGLES

El primer año de estudio se realizó durante la campaña 2013-2014 en la Estancia “San Miguel” (38°8'60”S; 61°19'60”O; 322 m.s.n.m), perteneciente a la firma Gurena S.A., localizada en el partido de Coronel Pringles (Pcia. de Buenos Aires). En este establecimiento rural se realizan habitualmente, entre otras producciones agropecuarias, cultivos de girasol para semilla híbrida bajo riego con pivot. En dicha campaña, los lotes contenían diferentes genotipos parentales de Syngenta y su manejo estaba diseñado, coordinado y supervisado por personal de TecnoSeeds Argentina (<http://www.tecnoseeds.com>).

En este sitio se realizaron dos campañas de muestreo, cuyas fechas se ajustaron al momento de antesis máxima de los lotes (EF R5.5).

2.1.1 Primera campaña de muestreo

La primera de las visitas a la estancia San Miguel se efectuó entre los días 13 y 16 de enero de 2014. El lote de producción muestreado tuvo al trigo como cultivo antecesor, y contenía tres líneas progenitoras tradicionales de girasol:

- dos líneas parentales femeninas (androestéiles): H1 y H2
- un parental masculino (androfértil), M, restaurador de la fertilidad en ambas hembras.

Los genotipos H1 y H2 fueron sembrados en cuadros contíguos con el objetivo de facilitar las labores realizadas para implantar la línea androfértil, que fue común para ambas hembras. En todo el lote (Lote T), la siembra se realizó a una distancia de 0,7 m entre hileras y a una densidad aproximada de 65.000 plantas ha⁻¹. La disposición utilizada fue de 10

hileras de la hembra cada 2 hileras del macho (Figura 2.2 a). El split de siembra entre el macho y las hembras fue de 10 días.



Figura. 2.2: Lote de producción T. a: Disposición de líneas hembra y líneas macho; b: cuadros del material H1 (izquierda) y H2 (derecha) de la calle de circulación interna.

El servicio de polinización fue contratado a la Cámara de Apicultores Pampero Limitada (CAP), que proveyó colmenas con una reina en plena postura, 7 cuadros de cría, 9 cuadros de abejas y reservas de polen y miel (Figura 2.2 b). Las colmenas ingresaron al lote el 8 de enero, al inicio de la floración de las líneas androfértiles. Cabe aclarar que, en función de los porcentajes de cuajado obtenidos previamente por la empresa semillera, se colocaron 3 colmenas ha⁻¹ en el cuadro de la H1 y 4 colmenas ha⁻¹ en el cuadro de la H2.

Al momento de comenzar los muestreos se determinaron, en diez plantas tomadas al azar de los tres genotipos, algunos parámetros morfológicos vegetativos con el objetivo de caracterizar los materiales estudiados (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Características vegetativas promedio de cada genotipo de girasol en R_{5,5} en el lote T de producción de semilla híbrida. H1: hembra 1; H2: hembra 2; M: macho (n=10).

Genotipo	Altura de la planta (m)	Hojas totales	Hojas fotosintéticamente activas
H1	1.26 ± 0.08	25.90 ± 1.66	9.20 ± 1.55
H2	1.39 ± 0.08	32.20 ± 1.99	10.40 ± 2.46
M	0.93 ± 0.07	21.10 ± 1.97	14.70 ± 1.95

Como surge de la Tabla 2.2, en general, las plantas de las líneas parentales femeninas presentaban mayor altura y número de hojas totales que en el genotipo androfértil, sin embargo, este último mantenía una canopia fotosintéticamente activa más abundante. Este progenitor presentaba un tallo principal, ramificado desde de la base, rematando en un capítulo terminal de tamaño intermedio. Las ramificaciones foliadas, presentaban capítulos axilares y terminales menos desarrollados respecto del capítulo principal.

2.1.2 Segunda campaña de muestreo

El lote de producción muestreado en la segunda visita, realizada entre los días 27 y 30 de enero de 2014 cuando las plantas estaban en plena floración (EF R5.5), contenía los mismos materiales genéticos ya descritos pero con la mejora tecnológica de resistencia a herbicida Clearsol (Lote CL; Tabla 2.1).

La disposición de los parentales, la distancia entre plantas y surcos, la densidad y el split de siebra fueron similares al del lote T descrito previamente, aunque, en este caso, los materiales se sembraron sobre un barbecho de maíz en siembra directa.

Las colmenas ingresaron al lote el 24 de enero, con un servicio de polinización brindado por lam CAP con las mismas características que las mencionadas para el lote T. También se utilizaron 3 colmenas ha⁻¹ en el área de la H1CL y 4 colmenas ha⁻¹ en los cuadros de la H2CL.

Las características morfológicas de las plantas del lote CL (Tabla 2.3) fueron consistentes con las del lote T en cuanto a que en las líneas femeninas, las plantas fueron más altas que en el macho. La morfología de este progenitor fue similar a su par tradicional.

Tabla 2.3: Características vegetativas promedio de cada genotipo de girasol en R5.5 en el lote CL de producción de semilla híbrida. H1CL: hembra 1 Clearfield; H2CL: hembra 2 Clearfield; MCL: macho Clearfield (n=10).

Genotipo	Altura de la planta	Hojas totales	Hojas fotosintéticamente activas
H1CL	1.04 ± 0.16	27.60 ± 2.32	24.60 ± 2.84
H2CL	1.03 ± 0.08	33.10 ± 3.25	26.30 ± 2.75
MCL	0.77 ± 0.06	51.40 ± 28.23	42.20 ± 27.24

2.2 LOTES DE PRODUCCIÓN EN VILLALONGA

Durante la campaña 2014-2015, los estudios y la colección de material a campo se realizaron en un lote de producción de semilla híbrida de girasol perteneciente a un productor particular y en otro lote de producción manejado por TecnoSeeds, ambos en el área de riego de la localidad Villalonga, partido de Patagones.

2.2.1 Tercera campaña de muestreo

Los estudios se realizaron en un lote de producción de semilla híbrida en el establecimiento “El Ombú”, propiedad del Sr. Hugo Rodríguez, ubicado en cercanías a la localidad de Villalonga (39°53'41"S; 62°29'54"O), en el área de riego del VIRC, en el partido de Carmen de Patagones. En este caso y como es común para esa zona, la producción contaba con riego por gravedad. El manejo de esta producción estaba a cargo de un profesional agrónomo de la zona.

Esta campaña se realizó entre los días 26 y 30 de enero de 2015, en el momento de máxima antesis de los materiales, que correspondieron a las líneas progenitoras del genotipo híbrido DK OP 3945 alto oleico (AO):

- Una línea parental femenina (androestéril): HAO.
- Un parental masculino (androfétil): MAO.

En el lote AO, las líneas fueron sembradas a una distancia de 0,7 m entre hileras y a una densidad aproximada de 65.000 plantas ha⁻¹. La disposición utilizada fue de 10 hileras de la hembra cada 3 hileras del macho y el split, de una semana. Los machos fueron sembrados todos en la misma fecha y una de las líneas sembradas no contó con fertilización de Fósforo para que el atraso de su emergencia desface las fechas de floración, cubriendo más días con disponibilidad de polen. El servicio de polinización de *Apis mellifera* L. fue realizado por un apicultor de la zona proveyendo a razón de 3 colmenas ha⁻¹. Las características vegetativas generales del lote se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Características vegetativas promedio de cada genotipo de girasol en R5.5 en el lote AO de producción de semilla híbrida. HAO: hembra alto oleico. MAO: macho alto oleico (n=10).

Genotipo	Altura de la planta (m)	Hojas totales	Hojas fotosintéticamente activas
HAO	0.81 ± 0.07	31.60 ± 2.46	20.90 ± 4.36
MAO	0.98 ± 0.04	22.20 ± 1.75	13.90 ± 1.79

2.2.2 Muestreo complementario

Luego de finalizar con esta campaña de muestreo, se colectó material complementario de un lote de producción de semilla híbrida manejado por TecnoSeeds en cercanías a la localidad de Villalonga, que estaba regado por gravedad.

La visita se realizó el 30 de enero de 2015, en el momento de máxima antesis de los materiales, que en esta oportunidad fueron sólo los genotipos H2CL y MCL previamente descriptos (H2CL₂₀₁₅ y MCL₂₀₁₅).

2.3 ESTUDIOS REALIZADOS EN BAHÍA BLANCA

En la primera-verano de 2016, en el predio del Departamento de Agronomía de la UNS, ubicado en el Campus Palihue, Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires ($38^{\circ}41'41''S$; $62^{\circ}15'06''O$), se realizó la siembra en una parcela experimental y en macetas de semillas de algunos de los materiales utilizados en el año 2014 cedidas por la empresa multiplicadora. La finalidad fue obtener plantas de los genotipos muestreados a campo en condiciones reales de producción para profundizar algunos de los estudios que requerían parte de su proceso en condiciones controladas y en laboratorio.

En base al poder germinativo de la semilla facilitada por TecnoSeeds, fueron sembrados sólo los parentales Clearfield. En el caso de la parcela, se sembró el genotipo MCL a mediados de noviembre de 2016 a una distancia aproximada a 0,7 m entre hileras y se realizó riego por surco. La siembra en macetas se realizó con los materiales H1CL, H2CL y MCL, a mediados de diciembre.

2.4 CARACTERIZACIÓN EDAFOCLIMÁTICA DE LOS SITIOS DE MUESTREO

Los tres sitios de muestreo se encuentran comprendidos en el sudoeste bonaerense (Figura 2.3).

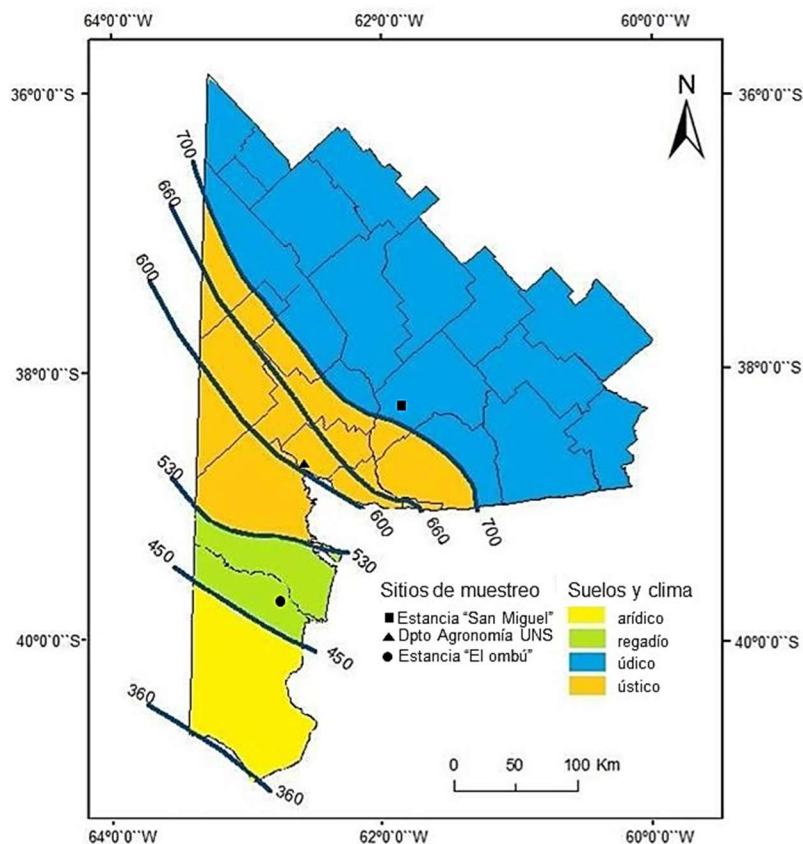


Figura 2.3: Suelo y clima de los tres sitios de muestreo. Modificado de Gabella et al., 2013.

Respecto al sitio donde se llevó a cabo el primer año de muestreo (Cnel. Pringles), el relieve presenta una superficie ondulada con pendientes que pueden llegar al 3% debido a la influencia de su cercanía con sistema orográfico de Ventania. De esta manera los suelos de la región presentan el perfil interrumpido por planchas de tosca que limitan su profundidad efectiva y llegan a aflorar en las zonas más altas de las lomas. Los suelos típicos se clasifican como argiudol franco fino en las zonas donde la tosca se halla a más de un metro de profundidad y el perfil logra un mayor desarrollo, argiudol típico somero en las pendientes más altas donde la tosca se encuentra entre los 100 y 50 cm de profundidad y hapludol petrocálcico, en las partes más elevadas donde la tosca es casi superficial (Salazar Lea Plaza et al., 1985).

El clima de la región, según la clasificación de Thornthwaite (1985), es subhúmedo seco. La temperatura media en el verano es de 20°C, con máximas absolutas de 35°C a 40°C. En invierno la temperatura media es de 8°C y la mínima absoluta puede descender hasta los -10°C. La precipitación media anual es de 610 mm, variando entre una máxima de 1.056 mm y una mínima de 396 mm. Las lluvias se concentran en los meses de octubre a marzo, con el 63,7 % del total anual. Sin embargo, en marzo y en abril se registran los valores mensuales más altos, con 283 mm y 204 mm, respectivamente. El período de bajas precipitaciones corresponde a los meses de junio, julio y agosto con un valor acumulado de 14% del total (Gil y Campo, 2000).

Los vientos predominantes del noroeste ocasionan violentos descensos de la humedad relativa que, sumado a variabilidad en las precipitaciones, produce un balance hídrico negativo para la mayor parte del año (AAPRESID, 2015). Estas condiciones determinan que en la mayor parte del territorio prevalezca el uso ganadero sobre el agrícola, presentándose un predominio del área de la localidad ocupada por actividades agrícola-ganaderas y planteos mixtos (Figura 2.4).

En cuanto al sitio donde se llevó a cabo el segundo año de muestreo (Villalonga), está caracterizado por planicies sólo interrumpidas por suaves ondulaciones medianosas o calcáreas que no alcanzan alturas importantes (Sánchez et al., 1998). Los suelos son en general relativamente profundos con abundancia de la fase arenosa predominando, en el partido de Carmen de Patagones, el orden Aridisol (Winschel, 2017). Los materiales originarios son arenas finas transportadas por el viento y depositadas sobre tosca y rodados líticos o materiales limo-arenosos más antiguos, débilmente consolidados (Sánchez et al., 1998). El desarrollo que han adquirido los mismos es relativamente escaso en términos de cantidad de horizontes o estratos componentes del perfil, contenido de nutrientes y presencia abundante de carbonato de calcio, relacionado a la escasa precipitación y la temperatura promedio en la que fue concebido (Sánchez, 2011). Las limitaciones edáficas están

relacionadas con la baja capacidad de retención de humedad y alta susceptibilidad a la erosión eólica (Peña Zubiarte et al., 1998).

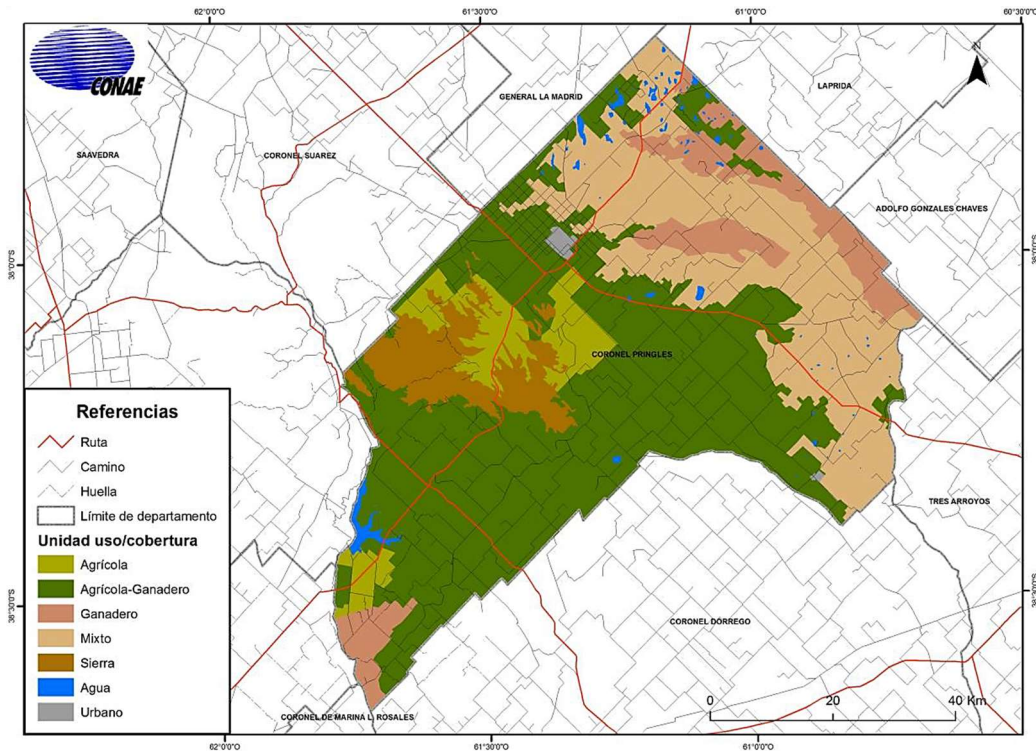


Figura 2.4: Mapa de uso y cobertura del suelo del partido de Cnel. Pringles. Tomado de Otero, 2016.

Los valores medios anuales de temperatura se encuentran comprendidos entre 14°C y 20°C con estaciones térmicas bien diferenciadas, es decir, veranos e inviernos rigurosos y primaveras y otoños moderados. Los rasgos de continentalidad aumentan de noreste a suroeste evidenciándose variaciones importantes en los montos de precipitación y cambios graduales en los valores medios de temperatura (Campo et al., 2004).

Las precipitaciones de esta área evidencian una gran deficiencia hídrica (300 - 500 mm año⁻¹) lo cual implica una fuerte dependencia del riego de los cultivos en forma permanente. Las precipitaciones disminuyen en dirección N-S desde 450 mm año⁻¹ a 350 mm año⁻¹ en el área sur del río Colorado. Predominan vientos provenientes del sector SO, NO y O. Estos vientos son continentales secos y determinan situaciones de estrés hídrico sobre todo en los meses de verano (Winschel, 2017).

Por su parte, el área de Bahía Blanca, sitio donde se realizaron las parcelas experimentales y el cultivo de plantas en maceta, presenta un clima templado con una temperatura media anual de 15,3°C (periodo 1960-2010). La estacionalidad térmica en la región es importante, con amplitudes anuales significativas. La media estival es 22,3°C y la invernal 9,5°C (Ferrelli, 2016).

Las lluvias otorgan un carácter sub-húmedo o de transición a esta región. A pesar de la proximidad al mar, el efecto de continentalidad se pone de manifiesto al analizar las

oscilaciones térmicas anuales (Mormeneo, 2003). Teniendo en cuenta la Clasificación climática de Thornthwaite (1985), el clima de Bahía Blanca se ubica dentro del grupo “Subhúmedo seco con nulo o pequeño exceso de agua”. La precipitación media anual es de 644,6 mm (periodo 1960-2010). Al igual que la temperatura, la precipitación presentó diferencias notables a escala estacional. Dentro del período informado por la bibliografía consultada (1960-2010), el verano se ubica como la estación más lluviosa con una media de 206,2 mm (Ferrelli, 2016). La velocidad media anual del viento es de 24 Km h⁻¹ (periodo 1991-2000) y la dirección predominante es del cuadrante noroeste (Mormeneo, 2003).

El suelo donde se ubicaron las parcelas experimentales es clasificado taxonómicamente como Ustipsamment típico (Soil Survey Staff, 2014).

Si bien las descripciones dadas plantean déficit hídrico en los tres sitios de estudio, la suplementación de los sistemas con distintos tipos de riego garantizó la capacidad de campo de dichas producciones.

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE NÉCTAR

3.1 INTRODUCCIÓN

El néctar y el polen son considerados recompensas florales primarias para los polinizadores pero su producción por parte de la planta tiene finalidades distintas. Si bien el polen, por su alto valor nutricional, interviene en la atracción de los polinizadores, tiene como función principal transportar la gameta vegetal masculina. En el caso del néctar, este producto no tiene otra función conocida más que la de atraer a los vectores que participarán de la polinización (Vear et al., 1990).

En líneas generales, el néctar es una solución azucarada, sin embargo, su composición es muy variable, presumiblemente porque se produce para recompensar a una gran diversidad de polinizadores (Cruden et al., 1983; Abrahamczyk et al., 2017; Chalcoff et al., 2017; Parachnowitsch et al., 2018).

Los azúcares del néctar derivan de la sacarosa, translocada por el floema desde otros tejidos florales o sintetizada en el nectario (Nicolson y Thornburg, 2007). Este disacárido y los monosáridos que lo componen (fructosa y glucosa), constituyen los tres tipos de azúcares más frecuentes. La cantidad relativa de cada uno en solución está determinada por la enzima invertasa, que hidroliza a la sacarosa antes o durante la secreción (Pate et al., 1985; Minami et al., 2021), y es una característica relativamente constante cuando se analizan muestras de néctar de diferentes individuos dentro de una misma especie (Nicolson y Thornburg, 2007).

Esta fuente de carbohidratos puede ser directa de la fotosíntesis realizada por el tejido en el mismo nectario o por cualquier otra parte de la planta, o bien puede provenir de un almacenamiento temporal (en forma de almidón) en las células del parénquima (Pacini et al., 2003). Ambos procesos están estrictamente relacionados con la tasa de secreción: una tasa de secreción de néctar muy alta requiere almacenamiento de almidón en amiloplastos, mientras que una baja tasa de secreción de néctar es a menudo asociado con cloroamiloplastos (Durkee et al., 1981; Belmonte et al., 1994; Nepi et al., 1996; Maldonado y Otegui, 1997).

La presencia de otros tipos de azúcares menos frecuentes en el néctar puede ser consecuencia de la composición de la savia del floema, que contiene azúcares que pasan sin transformarse a través de los nectarios (Jackson y Nicolson, 2002). Entre éstos se pueden citar monosacáridos como manosa, arabinosa, xilosa; disacáridos como maltosa, melibiosa o, más raramente, oligosacáridos como rafinosa, melezitosa, estaquiosa.

Aproximadamente el 10% del peso seco del néctar está representado por muchas clases de metabolitos distintos al azúcar, entre los cuales se incluyen aminoácidos (Baker y

Baker, 1973; Nepi et al., 2012), vitaminas (Griebel y Hess, 1940), alcaloides (Richardson, 2015), compuestos fenólicos (Ferrerres et al., 1996), terpenoides (Tholl et al., 2005), lípidos (Kram et al., 2008), hormonas (Lipp, 1990) y proteínas (Thornburg et al., 2003). Al igual que los azúcares, la composición y las cantidades de estos compuestos son muy variables entre las especie vegetales y sus funciones biológicas aún no se comprenden completamente (Galetto y Bernardello, 2004).

De la Barrera y Nobel (2004) plantean dos posibles teorías para interpretar el proceso de secreción de esta recompensa. Por un lado, la secreción podría haberse originado como una fuga resultante de la debilidad estructural del tejido en desarrollo de la flor expuesto a la presión hidrostática elevada del floema. Las estructuras por las que esta solución toma contacto con el exterior, ya sean estomas abiertos sin células subsidiarias (Fahn, 1988; Davis y Gunning, 1992; Gaffal et al., 1998), células secretoras de la epidermis (Kronstedt et al., 1986) o tricomas (Fahn, 1979), actúan de manera pasiva en el proceso de secreción (Nepi, 2007), avalando esta teoría. La otra hipótesis propuesta se relaciona con la excreción de azúcares. La misma plantea que, al ser la floración un período de alto consumo de agua durante el cual los pétalos deben crecer y adquirir turgencia para que las flores puedan abrirse, la secreción de néctar podría interpretarse como un mecanismo para eliminar el exceso de solutos suministrados por el floema y generar así el potencial de presión para que el floema siga ascendiendo.

Estudios recientes han mostrado el rol fundamental de las enzimas invertasas de la pared celular en la secreción de néctar. Éstas, con su acción de desdoblamiento de la sacarosa a fructosa y glucosa, tienen dos efectos: (1) crean una fuerza motriz constante para la exportación de sacarosa, y (2) crean un potencial de agua negativo haciendo que el agua se mueva hacia el azúcar, formando así gotas de néctar que se liberan de forma pasiva al exterior (Heil, 2011; Roy et al., 2017; Minami et al., 2021).

La cantidad de néctar secretado y su concentración pueden ser modificadas por diferentes factores ambientales, siendo la temperatura y la humedad relativa los más estudiados (Corbet et al., 1979); y también por características propias de las plantas, como la reabsorción selectiva de solutos o de agua (Búrquez y Corbet, 1991; Nicolson, 1995).

La concentración del néctar, que puede variar desde un 8% hasta un 80% (Frey-Wyssling, 1955), determina su viscosidad y se relaciona estrechamente con el pecoreo y por ende, con la polinización (Baker y Baker, 1983; Heyneman, 1983). En tal sentido, la atractividad de una planta productora de néctar dependerá de dos factores: el contenido de azúcar disponible en esta secreción y la energía gastada en colectarlo (Heinrich, 1979; Harder y Cruzan, 1990). Esto determinará que, si los demás componentes permanecen constantes, los polinizadores preferirán néctares con mayores concentraciones de azúcar, siempre que la mayor viscosidad no exceda un nivel que dificulte su colección (Kim et al.,

2011). En relación a esto Baker (1975) enunció que, energéticamente, son más eficientes los néctares con concentraciones intermedias, ya que a bajas concentraciones la cantidad de energía obtenida con el consumo puede resultar escasa, mientras que a altas concentraciones, sería negativa la relación costo-beneficio del pecoreo.

La caracterización de esta recompensa en cada especie, incluso en cada genotipo, es clave para entender la relación planta-polinizador y ha sido estudiado en diversos grupos de plantas (Galletto et al., 1994; Galletto, 1995; Amorim et al., 2013; Southwick, 2019).

En lo que respecta al girasol, el néctar tiene una composición de azúcares con una proporción bastante balanceada de fructosa y glucosa, encontrándose la sacarosa en cantidades menores y variables según el genotipo (Vear et al., 1990; Pham-Delegue et al., 1994). La proporción de este disacárido en el néctar está íntimamente relacionada a las invertasas de la pared celular del tejido del nectario (Aquino et al., 2021), dependientes del nivel de expresión del gen HaCWINV2 entre distintos genotipos (Prasifka et al., 2018).

Vear et al. (1990) no encontraron diferencias significativas entre la proporción de estos azúcares en líneas parentales androestériles, androfértiles e híbridos, presentándolo como un carácter estable entre los distintos materiales genéticos. En cambio, las encontraron en el volumen de néctar secretado, pero esta diferencia no se observó entre parentales femeninos y masculinos ni entre líneas parentales e híbridos, sino dentro de cada germoplasma. Estudios más recientes amplian lo expuesto por dichos autores comparando numerosos genotipos de girasol (parentales e híbridos), encontrando una secreción diferencial asociada al factor genético (Ion et al., 2007; Zajácz, 2011; Mallinger y Prasifka, 2017, Chabert et al., 2020).

Considerando el proceso de anthesis de las flores tubulosas de girasol dentro del capítulo, algunos autores (McGregor, 1976; Neff y Simpson, 1990) postulan que la secreción de néctar se limita principalmente a la fase estaminada, es decir, cuando están presentes las anteras y aún no ha emergido el estilo por su interior, periodo que ocurre en horas de la mañana. Por otro lado, Fell (1986) propuso que la disponibilidad de néctar residual en las flores pistiladas y esta liberación de néctar en las flores estaminadas al inicio de la dehiscencia de las anteras, promovería el movimiento de las abejas sobre las flores en ambos estadios sexuales y ayudaría a asegurar una polinización exitosa. En este contexto, estudios de secreción más actuales ubican el pico de secreción entre las 9 y las 11hs, acompañado de otro pulso de menor magnitud, ubicado entre las 13 y las 15hs (Zajácz, 2011).

En la producción de semilla híbrida de girasol, la secreción de néctar tiene un rol muy importante ya que es la única recompensa disponible en las líneas parentales femeninas, que no cuentan con producción de polen. En este sistema, es esencial que las abejas sean atraídas por ambos tipos de parentales y que se muevan entre ellos en el momento de

coincidencia de la disponibilidad de polen y la receptividad de los estigmas (Susic Martin y Farina, 2016). En tal sentido, se han reportado valores elevados en la heredabilidad de la secreción de néctar (94,44%) que alientan la factibilidad de la selección a través de este carácter y su utilización en programas de mejoramiento que contemplarían, no sólo altos rindes sino un aumento de la eficiencia de producción de semilla híbrida en esta especie oleaginosa (Joksimović et al., 2003).

La variabilidad en la secreción de néctar no sólo ocurre entre genotipos dentro de la misma especie, sino que además se puede dar entre flores dentro de una inflorescencia. Si bien la cantidad de flores abiertas en simultáneo o la presencia de inflorescencias compuestas son atributos visuales que operan de forma positiva en relación a la atractividad de los polinizadores (Harder y Cruzan, 1990; Andersson, 1991; Thompson, 2001), el hecho de que todas las flores abiertas secreten néctar puede estar sujeto a un gasto energético muy alto. La producción de esta recompensa puede demandar hasta el 37% de la energía de una planta, por ende estará sujeta a un balance entre el perjuicio de su costo energético y los beneficios del incremento en la producción de semilla fértil gracias a los polinizadores atraídos (Pyke, 1991). Algunos trabajos exponen la existencia de “flores vacías” o “engañosas”, es decir, flores que no secretan néctar, coexistiendo junto con flores que presentan esta recompensa (Bell, 1986; Thakar et al., 2003; Anand et al., 2007). La variabilidad en la secreción podría ser una estrategia para manipular a los polinizadores (Gilbert, 1991; Biernaskie et al., 2002; Kessler et al., 2012) y lograr que realicen el trabajo requerido con un menor gasto energético por parte de la planta.

Con la longitud de las visitas en un mismo individuo, la relación de polen propio/polen externo aumenta y también lo hace la tasa de geitonogamia (polinización entre las flores de la misma planta). Para maximizar la exportación de polen y evitar la autopolinización, sería ideal que la planta recibiera un gran número de visitas de polinizadores que se posen en una sola flor de cada planta. Esto propone un dilema: en la realidad, casi todas las características que conducen a una mayor atractividad para los polinizadores también implican secuencias más largas de visita dentro de un mismo individuo (Klinkhamer y de Jong, 1993).

Según Harder y Barrett 1995, la estrategia de presentar pocas flores abiertas en el día y floraciones prolongadas en el tiempo, estrategia de floración conocida como de “estado estacionario”, maximiza el cruzamiento relacionado principalmente al fitness masculino, es decir, la cantidad de granos de polen exportados a otras plantas. Los aumentos de la atractividad de la planta resultan en aumentos de este parámetro sólo cuando, en cada aproximación, el polinizador visita menos del 25% de las flores disponibles. Cuando las

visitas dentro de la misma planta están por encima de ese nivel, el fitness masculino disminuye (Klinkhamer et al., 1994).

Las plantas con muchas flores abiertas en el día, es decir, que desarrollan una estrategia de floración conocida como de “gran impacto” en la cual se produce la sincronización de la antesis en un corto período de tiempo, podrían regular la duración de la secuencia de visitas mediante el ajuste de la variabilidad de la secreción del néctar (Biernaskie et al., 2004).

La prolongación de la secuencia de visitas (mayor cantidad de flores visitadas por planta) y la permanencia por más tiempo en cada flor cuando esta recompensa es abundante, han sido estudiados por diversos autores en pos de entender los comportamientos de pecoreo en recursos florísticos con recompensas variables (Faegri y Van der Pijl, 1979; Zimmerman, 1983; Klinkhamer y de Jong, 1990; Hodges, 1995).

En tal sentido, han sido propuestas dos estrategias relacionadas a la actividad de los polinizadores. La primera de ellas, llamada “hipótesis de recompensa decreciente”, propone que un polinizador visita las flores en orden decreciente de calidad de néctar, interrumpiendo esta tarea cuando la misma se encuentra por debajo de un determinado umbral prefijado (Charnov, 1976; Pyke et al., 1977; Stephens y Krebs, 1986; Dreisig, 1989; Pappers et al., 1999). La segunda estrategia, llamada “hipótesis de recompensas impredecibles”, establece que un polinizador no visita las flores en ningún orden en particular pero si, que intenta evitar la variabilidad de recompensas dentro de una misma planta (Stephens y Krebs, 1986; Kacelnik y Bateson, 1996).

El néctar es secretado con ritmos particulares durante la vida de una flor, y puede presentar diferentes patrones según los distintos tipos de polinizadores que visitan las flores (Cruden et al., 1983; Galetto y Bernardello, 1992). Muchos autores han estudiado, en diversas especies, patrones de secreción temporales (dinámica de la secreción) evaluando los procesos de secreción y reabsorción que ocurren a nivel de los nectarios a lo largo de los días en que se produce la floración (Raw, 1953; Torres y Galetto, 1998; Nepi et al, 2011; Adgaba et al., 2017; Souza et al., 2017). Sin embargo, son muy escasos los estudios que describen patrones espaciales de distribución en las inflorescencias complejas que cuentan con varias flores abiertas en simultáneo. Este es el caso de la inflorescencia del girasol, en la que 2-3 anillos concéntricos de flores tubulosas abren diariamente en el término de una semana aproximadamente, tiempo en el cual se completa la diferenciación y antesis de las flores en el receptáculo de cada capítulo. Si bien Sammataro et al. (1984) mencionaron la existencia de flores secretoras y no-secretoras en esta especie, no se encuentra bibliografía que describa la disposición de las mismas dentro de la inflorescencia, pudiendo ésto influir en la disponibilidad de esta recompensa y modificar el comportamiento de los polinizadores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la cantidad y calidad de la secreción de néctar de las líneas parentales estudiadas en condiciones reales de producción
- Evaluar la cantidad de néctar secretado por las líneas parentales estudiadas en invernáculo
- Estudiar la distribución de flores secretoras y no secretoras en el capítulo de las líneas parentales estudiadas en invernáculo

3.3 ESTUDIOS A CAMPO

3.3.1 Materiales y métodos

El día previo a la toma de muestras de néctar, se seleccionaron e identificaron 10 capítulos de cada parental en R5.5, estado floral que permitió contar con las flores necesarias para los días consecutivos de trabajo considerando los ciclos de flores que abren diariamente. Una vez seleccionados los capítulos, se los cubrió con cofias de friselina para evitar la visita de los polinizadores que pudieran interferir en la cuantificación de la producción de néctar (Figura 3.1 a).



Figura 3.1: Muestreo de néctar. a: Capítulos protegidos con cofias; b: Toma de muestra de néctar con microcapilar.

Durante tres días consecutivos, aproximadamente a las 9 h, cuando esta especie presenta un pico de secreción (Zajác, 2011), se realizó la toma de muestras de néctar (Figura 3.1 b) utilizando microcapilares de 1 μ L (Figura 3.2 a). En cada capítulo se muestrearon 20 flores al azar, de manera de alcanzar el volumen necesario para los pasos siguientes. Así, se registraron los siguientes parámetros:

- *Porcentaje de flores secretoras* (PFS, %): número de flores (dentro de las 20 muestreadas) en las que se pudo colectar néctar al introducir el microcapilar
- *Néctar total secretado* (NTS, μL): cantidad de néctar colectado por capítulo midiendo la/s columna/s de néctar del/los microcapilar/es con un calibre Fisher Scientific con una precisión de 0,1 mm y dividiendo la medida registrada por 32 mm, el largo del capilar (Figura 3.2 b)
- *Néctar secretado por flor* (NSF, μL): cociente entre el NTS y el número de flores contabilizadas como secretoras por capítulo.

Posteriormente, se determinó la cantidad de azúcar midiendo la concentración del néctar con un refractómetro de mano (Tourn, 2013). Para ello, se descargaba el contenido del microcapilar sobre el prisma y se agregaban 10 μL de agua destilada con una micropipeta Hamilton. Luego de homogeneizar con la aguja de esta pipeta se tomaba la lectura del índice de refracción de la solución (Figura 3.2 b).



Figura 3.2 a: Microcapilar de 1 μL . b: Instrumental utilizado para medir Néctar total secretado y Contenido de azúcar total.

Dado que el refractómetro indica la concentración masa de soluto/masa de solución (grados Brix), los datos obtenidos fueron transformados para obtener la concentración en masa de soluto/volumen de la solución (Bolten et al., 1979). Esto permitió calcular los siguientes parámetros:

- *Contenido de azúcar total* (CAT, mg): cantidad de azúcar contenida en el nectar colectado por capítulo
- *Contenido de azúcar por flor* (CAF, mg): cociente entre el CAT y el número de flores contabilizadas como secretoras por capítulo.
- *Concentración de azúcar del néctar* (CN, %): calculado a través del CAT y el NTS.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2008). Para el estudio más profundo de los datos, los materiales utilizados en el año 2014 se analizaron de manera conjunta, ya que, como se mencionó anteriormente, diferían sólo en la portación de la tecnología Clearfield y estaban situados en el mismo campo de producción. De esta manera, además de aumentar los grados de libertad, se pudo testear el efecto de dicha mejora tecnológica en los parámetros de néctar evaluados. Cada parámetro estudiado se evaluó a través de un ANOVA doble anidado teniendo en cuenta la interacción entre el factor genotipo y la presencia o no de la tecnología CL. Adicionalmente se analizó la aditividad de varianza que aportó cada uno de los factores intervinientes en el diseño (Genotipo, Tecnología, Interacción Genotipo*Tecnología, Día y error).

Los materiales AO se evaluaron a través de un ANOVA en Bloque Anidado.

Todas las comparaciones de medias se realizaron con el test LSD de Fisher con un nivel de significación del 0,05. Las variables NTS, NSF y CN fueron transformadas con la función $f(x) = \ln(x*1000)$, dado que los datos no cumplían con los supuestos de homocedasticidad y normalidad requeridos por el estadístico utilizado.

Finalmente se realizó un análisis multivariado incluyendo todos los materiales con el fin de evaluar la relación de los parámetros entre sí, más allá de las diferencias respecto a los genotipos, sitios y año de producción. Para descartar un efecto de los factores antes mencionados, se evaluó el agrupamiento de puntos en el gráfico resultante utilizando símbolos en común sólo para los materiales que compartieron esos factores.

3.3.2 Resultados y discusión

3.3.2.1 Flores secretoras

En este parámetro, la existencia de interacción entre los genotipos y la mejora tecnológica CL forzó a analizar por separado los materiales H1, H2 y M de los materiales H1CL, H2CL y MCL.

El PFS difirió entre genotipos pero la media general se ubicó alrededor del 40%, coincidente con lo estudiado por Samataro et al. (1984) para distintas variedades de girasol y por Wist y Davis (2008) para *Echinacea pallida*, otra especie de la misma familia. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre H1, H2 y M siendo H2 el parental que presentó menor PFS y M el que presentó mayor PFS ($F_{2,8} = 18,01$; $p = 0,001$; Figura 3.3 a). En el caso de los materiales CL, nuevamente H2CL presentó menor PFS, difiriendo significativamente de la H1CL ($F_{2,8} = 15,14$; $p = 0,001$). El MCL no mostró diferencias significativas con ninguna de las dos hembras (Figura 3.3 b). Tampoco se hallaron diferencias entre los materiales alto oleico, HAO y MAO, presentando promedios de flores secretoras muy similares ($F_{1,54} = 0,07$; $p = 0,82$) (Figura 3.3 c).

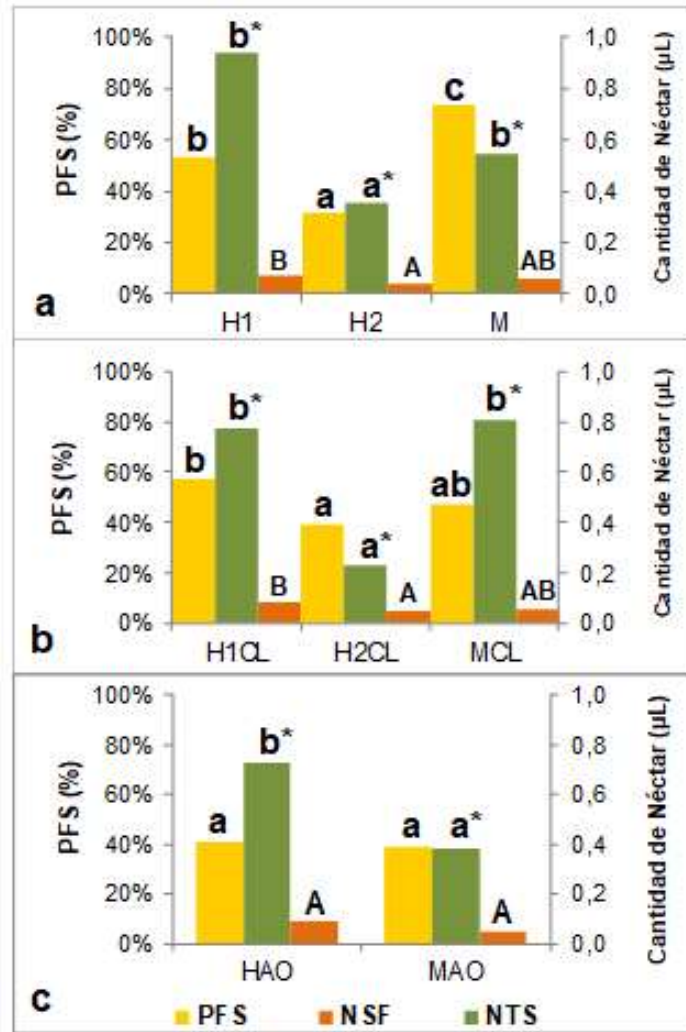


Figura 3.3: Valores promedio de Néctar total secretado (NTS, μL), Néctar secretado por flor (NSF, μL) y Porcentaje de flores secretoras (PFS, %) en los parentales tradicionales (a), Clearfield (b) y alto oleico (c). Las comparaciones estadísticas corresponden a cada grupo de parentales (H1-H2-M, H1CL-H2CL-MCL y HAO-MAO). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.01$) en el PFS. Letras minúsculas con asterisco diferentes indican diferencias significativas en el NTS. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas en el NSF.

3.3.2.2 Néctar total secretado

Como se observa en las Figuras 3.3 a y b, las hembras del complejo H2 (H2 y H2CL) secretaron significativamente menos néctar que los restantes materiales ($F_{2,8} = 10,17$; $p = 0,0063$). Por su parte, entre los parentales AO se encontraron diferencias altamente significativas ($F_{1,56} = 6,86$; $p = 0,0113$) observándose que la secreción en la HAO fue mayor que en el MAO (Figura 3.3 c).

Tal como se menciona en los resultados recién expuestos, la cantidad de néctar secretado se ha presentado por otros autores como un parámetro variable en función de los distintos genotipos de girasol que se cultivan (Atlagic et al., 2003; Joksimovic et al., 2003; Mallinger y Prazifka, 2017). Sin embargo, existe muy poca bibliografía que mencione el efecto de los eventos tecnológicos incorporados en el proceso de mejoramiento de las líneas

sobre la secreción de esta recompensa (Chabert et al., 2020). En este estudio, el ANOVA doble anidado no arrojó interacción entre los materiales con y sin tecnología CL. Esto determinó, por un lado, que dichos materiales puedan ser analizados en conjunto, y por otro, inferir que la secreción de néctar sería independiente del evento tecnológico.

3.3.2.3 Néctar secretado por flor

Los valores que se observan en la Figuras 3.3 se encuentran entre los citados por la bibliografía consultada. Tepedino y Parker (1982) mencionan valores de NSF entre 0,02 a 0,16 $\mu\text{L flor}^{-1}$. Vear et al. (1990) en un estudio que realizó en líneas androestériles, androfértiles y sus descendencias (F1), encontró un rango más amplio (entre 0,02 y 0,32 $\mu\text{L flor}^{-1}$), probablemente asociado a la diversidad de genotipos utilizados (parentales e híbridos). Estudios en líneas más actuales mencionan valores promedio de 0,023 $\mu\text{L flor}^{-1}$ (Segarra, 2020).

Las hembras H2 y H2CL presentaron una cantidad de NSF significativamente menor que las del complejo H1 ($F_{2,8} = 6,96$; $p = 0,02$). Los machos no difirieron significativamente de las dos hembras (Figura 3.3 a y b). En el caso de los materiales AO, las flores de las hembras presentaron casi el doble de secreción por flor que las del macho (HAO = 0,087 y MAO = 0,047; $F_{1,56} = 12,87$; $p = 0,0007$) (Figura 3.3 c).

La relación entre NSF y PFS como factores determinantes del NTS mostró distintos balances entre los genotipos estudiados. En los materiales muestreados en el año 2014 se observó que la menor cantidad de NTS de las H2 estuvo relacionada no sólo al bajo PFS sino a la menor cantidad de néctar secretado por cada una de ellas. En cambio en el complejo AO, la superioridad en NTS observada en la HAO, estaría más asociada a la cantidad de néctar que secretó cada flor que al PFS.

Además de las relaciones planteadas de estas comparaciones surge que las diferencias en los parámetros asociados a la cantidad de néctar secretado no se dan entre parentales de distinto sexo, es decir, entre líneas androestériles y androfértiles, sino, entre los genotipos en general, lo que también fue observado por Tepedino y Parker (1982), Vear et al.(1990) y Mallinger y Prazifka (2017).

3.3.2.4 Contenido de azúcar total y contenido de azúcar por flor

No se detectaron diferencias significativas en estos parámetros entre los materiales estudiados (Tabla 3.1). No obstante, los materiales del complejo H1 (con y sin tecnología CL) mostraron los valores promedio de CAT más altos entre los mostrados en la tabla 6, coincidentemente con la mayor secreción de néctar total.

Tabla 3.1: Valores promedio y desvíos estándar de la cantidad de azúcar total (CAT; mg) y la cantidad de azúcar por flor (mg). ns: no se encontraron diferencias significativas en las comparaciones realizadas.

Parental	Azúcar total (mg)	Azúcar por flor (mg)
H1	0,33 ± 0,06 ns	0,03 ± 0,003 ns
H2	0,17 ± 0,17 ns	0,03 ± 0,016 ns
M	0,25 ± 0,05 ns	0,02 ± 0,005 ns
H1CL	0,41 ± 0,22 ns	0,04 ± 0,013 ns
H2CL	0,26 ± 0,06 ns	0,04 ± 0,013 ns
MCL	0,21 ± 0,00 ns	0,02 ± 0,005 ns
HAO	0,25 ± 0,08 ns	0,03 ± 0,011 ns
MAO	0,24 ± 0,10 ns	0,03 ± 0,004 ns

3.3.2.5 Concentración de azúcar del néctar

La CN es un factor íntimamente relacionado a la eficiencia de pecoreo y, por ende, a la selección que realiza la abeja al momento de recolectar dicha recompensa. El promedio general de todos los materiales observados en este estudio fue cercano al 48%, con un máximo en las H2CL de 74% y un mínimo del 28% en los M. Estos valores se encuentran dentro del rango útil mencionado por Ión et al. (2007), quienes expusieron que, para que el balance energético del pecoreo de la abeja melífera sea favorable, la concentración del néctar se debería ubicar entre el 50-55%, con un mínimo de 15% y un máximo de 85%. Otros estudios informan concentraciones promedio del 60% en materiales híbridos (Ion et al., 2007; Zajácz, 2011) y entre el 30 y 50% en estudios que incluyeron híbridos y líneas parentales (Vear et al., 1990).

En la comparación entre los genotipos estudiados, la CN fue significativamente mayor en las hembras del complejo H2 comparadas con las del complejo H1 y los machos ($F_{2,8} = 6,83$; $p = 0,02$), no encontrándose diferencias significativas entre estos dos últimos materiales (Figura 3.4 a y b). En los materiales AO, el macho mostró un promedio de CN significativamente mayor que la hembra ($F_{1,55} = 36,4$; $p < 0,001$) (Figura 3.4 c). Como se observa, los materiales que presentaron valores mayores de NTS fueron los que secretaron un néctar menos concentrado y viceversa. Ion et al. (2008) mencionan la misma relación negativa entre CN y NTS en sus estudios sobre genotipos híbridos. Dada la similitud encontrada en los contenidos de azúcar medidos, se puede inferir que la diferencia de concentración entre los materiales comparados está principalmente asociada a las diferencias en la cantidad de néctar secretado.

Si bien los valores de CN se encuentran entre los rangos informados, las diferencias encontradas entre los parentales podrían tener implicancias en la atractividad de los genotipos. Teniendo en cuenta que los valores en la cantidad de azúcar por flor son

similares, surge claramente que las hembras del complejo H2 presentan néctares con una mayor viscosidad, lo que podría requerir un mayor esfuerzo de pecoreo.

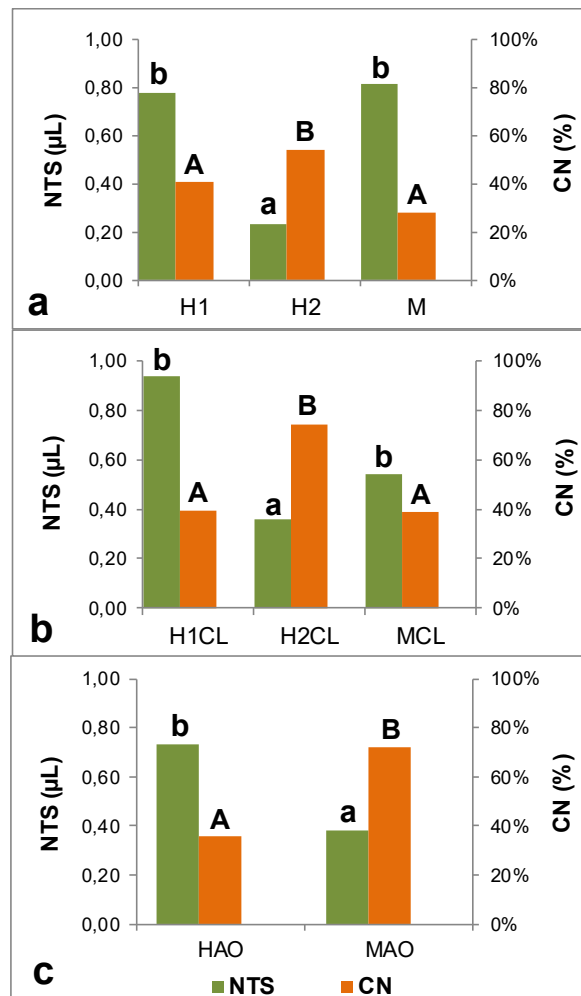


Figura 3.4: Valores promedio de Néctar total secretado (NTS, µL) y Concentración (CN, %) en los parentales tradicionales (a), Clearfield (b) y alto oleico (c). Las comparaciones estadísticas corresponden a cada grupo de parentales (H1-H2-M, H1CL-H2CL-MCL y HAO-MAO). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0.01$) en el NTS y letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas ($p < 0.01$) en CN.

3.3.2.6 Análisis de la variabilidad aportada por los factores

En muchos sistemas, no solo la secreción promedio de néctar puede ser un rasgo de interés, sino también, la variación de la producción en sí misma (Parachnowitsch et al., 2018). En tal sentido, interpretar la variabilidad que aportan los distintos factores que intervienen en el análisis de la producción de esta recompensa permitiría asociar las variables estudiadas a la influencia del genotipo o del ambiente.

La Figura 3.5 muestra la adición a la varianza que realizan cada uno de los factores incluidos en el diseño experimental correspondiente al año 2014. En los parámetros relacionados a la cantidad de néctar secretado (PFS, NTS y NSF) la mayor parte de la variabilidad estuvo aportada por el componente genético (línea parental). Por otro lado, en los parámetros asociados a la cantidad de azúcar en el néctar (CAT, CAF y CN) el

componente ambiental adquirió mayor importancia (determinado por el factor Día de muestreo), manifestándose esto en menor medida en el parámetro “Concentración” debido a que el mismo está también influenciado por la cantidad de néctar secretado.

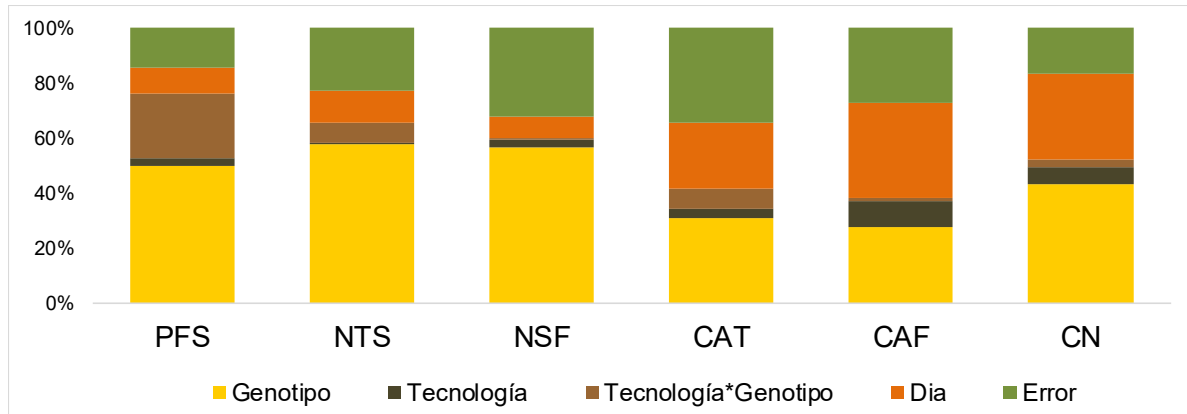


Figura 3.5: Porcentajes de adición a la varianza que aportan los distintos factores incluidos en el análisis estadístico de cada una de las variables estudiadas (PFS: % Flores secretoras, NTS: Néctar total secretado, NSF: Néctar por flor, CAT: Contenido de azúcar total, CAF: Contenido de azúcar por flor y CN: Concentración del néctar).

En tal sentido, estudios realizados en otras especies documentaron que la cantidad de néctar resulta más variable dentro y entre plantas que la concentración, es decir, presenta una influencia más fuerte del factor genético sobre el ambiental (Hodges, 1993; Galetto et al., 1998; Roldan-Serrano y Guerra-Sanz 2005; Wolff 2006; Dreisig, 2012). En el caso del girasol, esto también fue mencionado en líneas parentales y sus descendencias (Vear et al., 1990; Mallinger y Prasifka, 2017) y plantea una importante base para el desarrollo del mejoramiento en estas características que actualmente no son tenidas en cuenta.

3.3.2.7 Relación entre los parámetros estudiados

La Figura 3.6 muestra la relación entre las variables estudiadas a través de un análisis de Componentes Principales donde las componentes 1 y 2 en conjunto logran explicar el 87,4% de la variación total. La distribución homogénea de todos los puntos demuestra la inexistencia de un efecto debido al lote y año de producción.

La relación altamente significativa y positiva que se observa entre el PFS y el NSF con el NTS (Tabla 3.2) reafirma el balance entre estos parámetros planteado en la comparación entre parentales, manifestando cómo el número de flores participantes en la secreción y la capacidad individual de cada flor de secretar determinan, en conjunto, la cantidad total de néctar secretado.

Algunos de los coeficientes presentados en la Tabla 3.2 plantean relaciones esperadas, como NSF-NTS y CAF-CAT, que son variables dependientes entre sí ya que las asociadas a cada flor individual están calculadas a partir de las totales. Otras de las relaciones observadas a través de los coeficientes, plantean supuestos interesantes. Por

ejemplo, la relación positiva encontrada entre NSF y NTS con el CAT, indica que la cantidad de azúcar total obtenida en este estudio no llegó a un nivel límite sino, que aumentó a medida que se obtuvo mayor cantidad de néctar secretado.

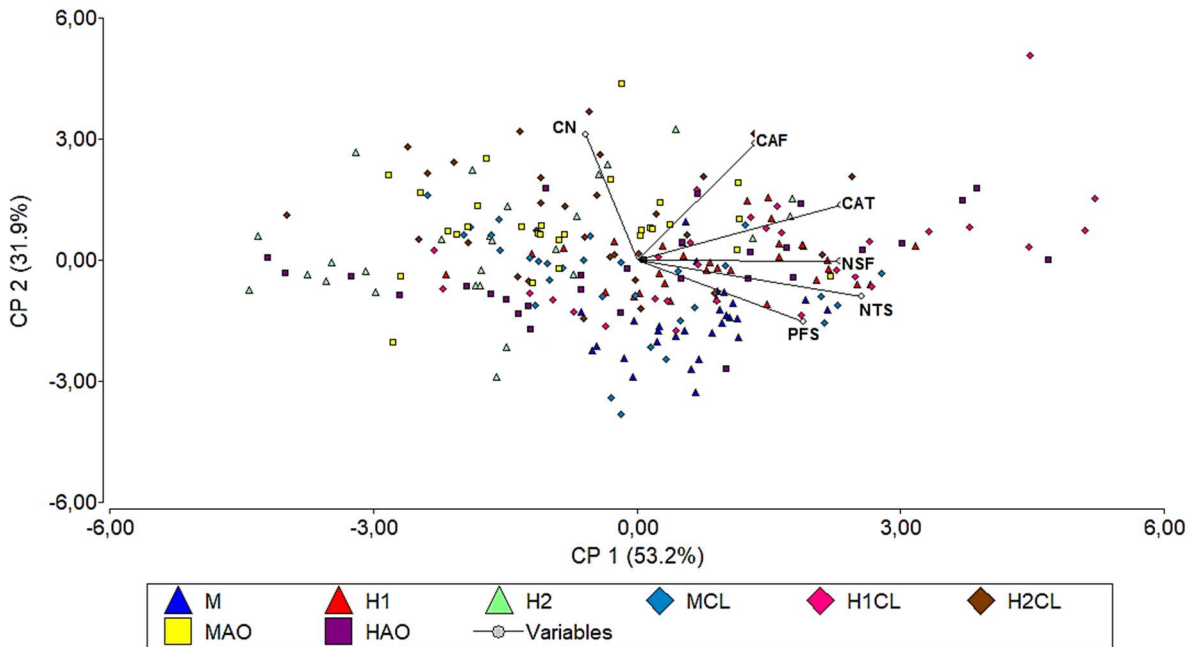


Figura 3.6: Análisis de componentes principales de todos los materiales estudiados y las variables de néctar estudiadas. % Flores secretoras (PFS), Néctar total secretado (NTS), Néctar por flor (NSF), Contenido azúcar total (CAT), Contenido azúcar por flor (CAF) y Concentración (CN). Los materiales genéticos que comparten forma en los símbolos, se situaron en el mismo lote de producción (triángulos para los materiales tradicionales, rombos para los CL y cuadrados para los AO).

Otra relación relevante fue la observada entre el NTS y la CN, que resultó altamente significativa e inversamente proporcional. Tal como fue mencionado en el análisis comparativo entre materiales, esto plantea una interesante hipótesis relacionada al balance energético de la planta a la hora de secretar néctar, el cual podría resultar de un equilibrio entre la cantidad y la calidad del mismo.

Tabla 3.2: Coeficientes de correlación y matriz de probabilidades del análisis de Componentes Principales para % Flores secretoras (PFS), Néctar total secretado (NTS), Néctar por flor (NSF), Contenido azúcar total (CAT), Contenido azúcar por flor (CAF) y Concentración del néctar (CN). * indica p significativo, ** indica un p altamente significativo.

	PFS	NTS	NSF	CAT	CAF	CN
PFS	-	**	**	**	0.1562	**
NTS	0,7935	-	**	**	**	**
NSF	0,3459	0,8164	-	**	**	**
CAT	0,535	0,699	0,6206	-	**	**
CAF	-0,0921	0,2544	0,496	0,7167	-	**
CN	-0,3635	-0,4078	-0,341	0,2049	0,5656	-

3.4 ESTUDIOS EN INVERNÁCULO

3.4.1 Materiales y métodos

Los estudios fueron realizados en plantas de los genotipos H1CL, H2CL y MCL que se obtuvieron a partir de la semilla facilitada por la empresa multiplicadora.

Se utilizaron tres plantas de cada genotipo cultivadas en macetas de 10 L a la intemperie, en primera instancia, para favorecer su normal desarrollo y luego mantenidas en invernáculo a partir del EF R4. El capítulo de cada planta permaneció cubierto con una cofia para evitar que el ingreso de algún insecto resulte en el robo de néctar, descubriéndose sólo al momento de realizar el muestreo (Figura 3.7).

A partir del EF R5, se registró el volumen (μL) de néctar individual secretado por todas las flores de la mitad derecha de cada capítulo que entraban en antesis cada día. Para ello, se utilizaron microcapilares de $0,25 \mu\text{L}$ a los que se les midió la columna de néctar con un calibre digital Fisher Scientific con una precisión de $0,1 \text{ mm}$.



Figura 3.7: Plantas de girasol en invernáculo con los capítulos cubiertos por cofias para evitar el robo de néctar.

Al comenzar cada día de muestreo se tomaron fotografías de los capítulos antes de la extracción del néctar con el objetivo de referenciar espacialmente todas las flores muestreadas y poder relacionar el dato de volumen obtenido con su ubicación exacta en el capítulo (Figura 3.8). Al finalizar la floración, se integraron las fotos de todos los días que le

insumió a cada capítulo completar la anthesis, obteniendo así un mapa de secreción en el que cada flor fue representada con un punto de color correspondiente a un rango de volumen de néctar secretado.



Figura 3.8: Fotografía de un capítulo en R5.5, en la que se numeran las flores de la mitad derecha que abren en el día, utilizada como referencia para la toma de muestras de néctar y el registro de la secreción de cada una de ellas.

3.4.2 Caracterización de la secreción

A partir de los datos registrados se calcularon las variables:

- *Porcentaje de flores secretoras* (PFS, %): proporción de flores que secretaron néctar sobre el total de flores muestreadas por día en cada capítulo.
- *Néctar promedio* (NP, μL): Promedio de secreción del capítulo teniendo en cuenta todas las flores medidas en cada día de muestreo (aún aquellas que no secretaron).
- *Néctar promedio secretoras* (NPS, μL): Promedio de secreción del capítulo contabilizando sólo las flores que secretaron néctar. Esta última variable describe la cantidad de néctar que secreta cada flor, al igual que la variable NSF descrita en los estudios a campo. Sin embargo, en el estudio realizado en condiciones controladas, la variable NSF se obtuvo a partir de datos individuales del néctar secretado por flor mientras que, en los ensayos a campo, la colección del néctar se realizó en un grupo de 20 flores.

Se compararon los genotipos mediante un ANOVA simple utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2008). La variable NP fue transformada con la función $\text{Ln}(x \cdot 1000)$ para cumplir con los supuestos de homocedasticidad y normalidad requeridos por el test utilizado.

Además, se realizaron regresiones que permitieron estudiar la relación entre las variables y se evaluó la evolución de las mismas a lo largo de los estadios fenológicos que atravesaron los capítulos.

3.4.2.1 Distribución de la secreción

Para estudiar la distribución de las flores que secretaban o no néctar entre las que abrían cada día de muestreo, se confeccionó una nueva variable a partir del mapa de secreción. La misma consistió en registrar, para cada flor muestreada, las seis que la rodeaban indicando el número de secretoras. No se calculó esta variable para el primer y el último día de floración por no poder contar con el número requerido de flores vecinas.

Con estos datos se calculó la probabilidad de que una flor no secretora presente una flor secretora vecina (P_{ns}) y la probabilidad de que una flor secretora presente una flor secretora vecina (P_s). A través de estos valores se definió ΔP como:

$$\Delta P = P_s - P_{ns}$$

Si existiera un efecto de agrupamiento entre las flores que secretan néctar, la probabilidad de encontrar una flor secretora entre las que la rodean sería distinta en una flor secretora que en una no secretora. Por esta razón, podríamos decir que si el día bajo análisis, el $\Delta P = 0$, las flores secretoras y no secretoras se distribuyen al azar. Por el contrario, si $\Delta P > 0$, la distribución de las flores secretoras es Agrupada y si $\Delta P < 0$, la misma es Regular.

Para estudiar la significancia de estas relaciones se realizó una prueba de hipótesis Chi-cuadrado en cada día de floración de cada uno de los capítulos muestreados. Siendo la hipótesis nula $H_0: \Delta P = 0$, la aceptación de la misma ($p > 0.2$) determinaría que la distribución de la secreción en ese día de muestreo es *aleatoria*, es decir, el número de flores secretoras que rodea una flor es independiente de si la flor central es secretora o no secretora. Por el contrario, el rechazo de la hipótesis planteada indica un tipo de distribución agrupada o regular.

Adicionalmente, para obtener una conclusión general de la distribución que presentaron los tres genotipos, se integraron los resultados diarios obtenidos utilizando una prueba t de medias. Con esta prueba también se evaluó si $\Delta P = 0$, es decir, si la distribución general resultó aleatoria.

Por otro lado, con el objetivo de testear si los sectores del capítulo tienen la misma proporción de flores secretoras y no secretoras, se dividió el mapa de secreción en 4 porciones (Figura 3.9) y se registró la cantidad de flores secretoras y no secretoras en cada una de ellas. Siguiendo el criterio descrito en Zar (2009) para pruebas de uniformidad en datos distribuidos circularmente, se adaptó una prueba de hipótesis Chi cuadrado, en la cual

se probó como hipótesis nula que los sectores eran homogéneos respecto a la proporción de flores secretoras y no secretoras. El estadístico obtenido siguió una distribución Chi cuadrado con $(F-1) * (C-1)$ grados de libertad, donde F fue el número de sectores y C el tipo de flor (secretora o no secretora).



Figura 3.9: Capítulo de girasol del parental MCL. Línea roja: medio capitulo (sector que fue utilizado para el estudio). Líneas negras: 4 sectores numerados. Flecha roja indica línea de flores abiertas sobre las que se tomaron las muestras de néctar.

3.4.3 Resultados y discusión

3.4.3.1 Caracterización de la secreción

El parental H2CL, tal como se observó en el ensayo a campo, presentó atributos negativos en relación a la secreción de néctar, obteniéndose resultados inferiores con respecto a los otros genotipos estudiados en los tres parámetros medidos (Figura 3.10).

El material androfértil resultó superior a la H1CL en el PFS ($F_{2,58} = 7,95$; $p = 0,0009$; Figura 3.10 a) y en el NP ($F_{2,54} = 14,45$; $p < 0,0001$; Figura 3.10 b), lo cual difiere de lo determinado a campo, donde, en general, estos genotipos no presentaron diferencias significativas.

En un estudio similar al presente, donde midieron la cantidad de néctar secretado y otras recompensas florales en condiciones a campo e invernáculo, Mallinger y Prazifka (2017) también observaron estabilidad en las relaciones entre líneas con respecto a los dos tipos de ambientes. Además, los promedios de néctar secretado por flor, similares a los obtenidos en este estudio, fueron en general menores que los medidos en el cultivo a campo.

Estos autores lo adjudican a influencias ambientales como la temperatura, precipitación y humedad relativa.

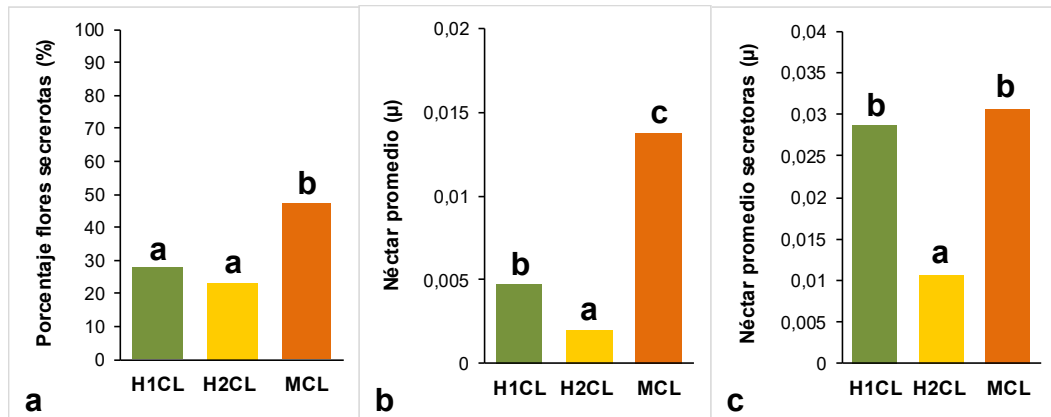


Figura 3.10 a: % Flores secretoras para los tres genotipos estudiados (H1, H2 y M); b: Néctar promedio (considerando todas las flores muestreadas); y c: Néctar promedio secretoras (considerando sólo las flores secretoras). Letras distintas indican diferencias significativas.

En el presente estudio, las condiciones de crecimiento de las plantas no fueron restrictivas, contando con fertilización adecuada y el riego suficiente que garantizó la capacidad de campo. Un factor limitante fue la necesidad de radiación que posee el girasol, la cual no pudo ser satisfecha completamente dentro del invernáculo y se manifestó desde los primeros estadios donde las plantas se presentaron algo etioladas. Para subsanar esta situación, las macetas con los distintos genotipos cultivados fueron trasladadas afuera del invernáculo hasta el momento de la toma de muestra de néctar. A pesar de esto, los capítulos presentaron un tamaño menor al observado a campo en condiciones reales de producción. Probablemente, el confinamiento de las raíces en envases de 10 L también pudo sumarse a lo anterior y ejercer un efecto restrictivo sobre el tamaño de las inflorescencias. Este desarrollo reducido del receptáculo es uno de los factores determinantes del número de flores tubulosas que se diferenciarán en el mismo (Aguirrezábal et al., 1996). Esta limitación podría influir en el menor volumen secretado, principalmente en las hembras, que no pudieron expresar su diámetro potencial de capítulo como los machos.

Muchos de los estudios que evalúan la heredabilidad de la cantidad de néctar secretado por distintas especies están realizados en condiciones controladas (cámaras de crecimiento o invernáculos) dada la dificultad de interpretación de los resultados a campo. En esta última condición, resulta difícil analizar el efecto del genotipo ya que lo observable es la expresión fenotípica, es decir, la interacción entre el genotipo y el ambiente. Sin embargo, a pesar de la influencia de este último factor, evidencias del efecto genotípico en la secreción del néctar a campo han sido documentadas por varios autores (Campbell, 1996; Boose, 1997; Vogler et al., 1999) y demuestran la gran heredabilidad de este carácter.

Por otro lado, se encontró un ajuste lineal en los tres genotipos estudiados entre el PFS (%) y el NPS (μL) (Figura 3.11).

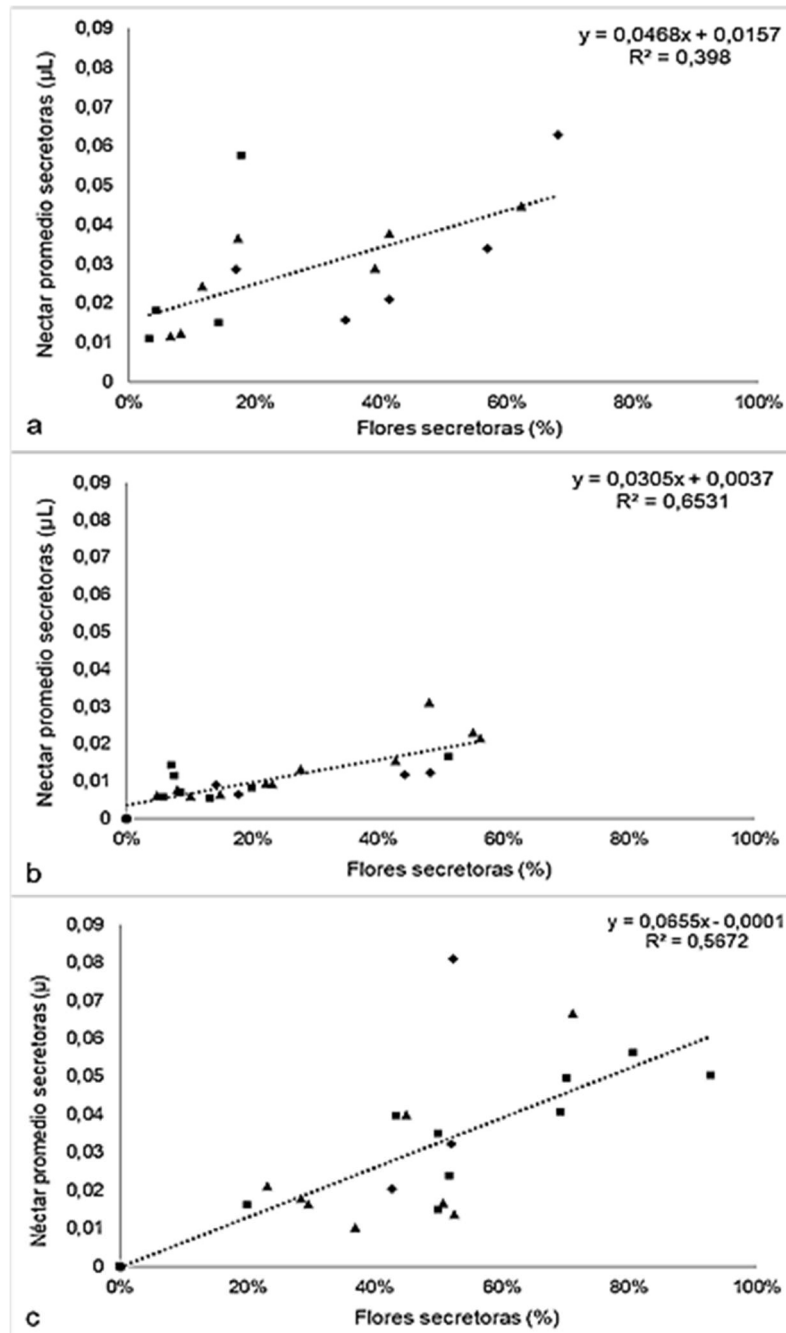


Figura 3.11: Néctar promedio secretoras (μL) en función del % de Flores secretoras en los materiales H1CL (a), H2CL (b) y MCL (c). Cada punto corresponde a un día de muestreo de cada uno de los tres capítulos utilizados por parental. Rombos representan muestreos en capítulos de estadios R5.1, R5.2 y R5.3; triángulos, estadios R5.4, R5.5 y R5.6; cuadrados, estadios R5.7, R5.8 y R5.9.

Esta relación indica que, al aumentar la proporción de flores secretoras entre las que alcanzan la antesis en cada día estudiado, aumenta la secreción de néctar de cada una de las mismas. Los coeficientes de correlación de Pearson observados avalan esta conclusión (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Coeficientes de correlación de Pearson y probabilidades entre los factores “% de flores secretoras” y “Néctar promedio secretoras” en los materiales H1CL, H2CL y MCL.

	Coeficiente de correlación	Probabilidades
H1CL	0,630879	0,008781
H2CL	0,8081736	0,0000018
MCL	0,7531483	0,0000336

Tal como fue mencionado al inicio de este capítulo, el floema es la principal fuente que abastece a los nectarios. Ya sea por una fuga producida por la elevada presión o la necesidad de excretar azúcares, el néctar es secretado por las flores de manera pasiva en estrecha relación a la cantidad de flores abiertas (De la Barrera y Nobel, 2004). Basándonos en estas teorías, el sector externo del capítulo debería presentar mayor secreción que el interno por contar con mayor cantidad de flores en anthesis de manera simultánea. Sin embargo, en el presente estudio la relación observada entre el porcentaje de flores secretoras y el néctar secretado por flor no estuvo condicionada por el estadio fenológico y esto se puede observar de manera gráfica con los distintos símbolos utilizados en la figura 3.11 (a, b y c), los cuales están distribuidos de manera homogénea. Entonces, es necesario pensar en una fuerza que aumente al incrementar la proporción de flores que secretan néctar y produzca un efecto impulsor que actúe incentivando a cada flor en su secreción individual.

Esta fuerza podría fundamentarse en la acción de las invertasas que ya han sido citadas por algunos autores como mediadoras de las relaciones fuente-destino de la sacarosa e impulsoras de su flujo en el néctar (Heil, 2011; Aquino et al. 2021; Minami et al, 2021). Luego de la descarga de la sacarosa desde el floema, su desdoblamiento en glucosa y fructosa en el nectario provocaría el movimiento de agua apoplástica, formando así la solución que sería secretada de forma pasiva. En los ensayos realizados por Minami et al. (2021) demostraron no sólo la relación entre la invertasa y la cantidad de sacarosa del néctar, sino un efecto de aumento de la cantidad de néctar secretado en los genotipos que presentaban una mayor actividad de esta enzima.

Se desconoce el factor determinante de la cantidad de flores secretoras en los genotipos estudiados, tópico que debería ser ampliado con nuevos estudios que apunten a la activación de genes en general y en particular, aquellos que tienen efecto sobre la invertasa (Kram et al., 2009; Prasifka et al., 2018) en cada flor individual dentro del capítulo.

3.4.3.2 Distribución de la secreción

La Figura 3.12 muestra los mapas de secreción de cada uno de los tres capítulos estudiados de cada material genético. En los mismos, los distintos colores utilizados para

identificar las flores secretoras muestran una distribución aparentemente aleatoria de su ubicación y de la cantidad de secreción.



Figura 3.12: Mapas de secreción de cada uno de los tres capítulos estudiado por genotipo. Símbolos distintos (círculos y cuadrados) delimitan las líneas de flores que abrieron cada día.

El estudio estadístico de la distribución de las flores secretoras, como se puede observar en la Figura 3.13, mostró que la mayoría de los ΔP resultaron cercanos a cero, correspondiéndose entonces con una distribución aleatoria. Esto indica que la evaluación de cada día por separado en cada genotipo mediante el Test Chi cuadrado dio como resultado que, en la mayoría de los casos, el número de flores secretoras que rodea a una flor es independiente de si la flor central es secretora o no secretora (símbolos de color negro en el gráfico de la Figura 3.13).

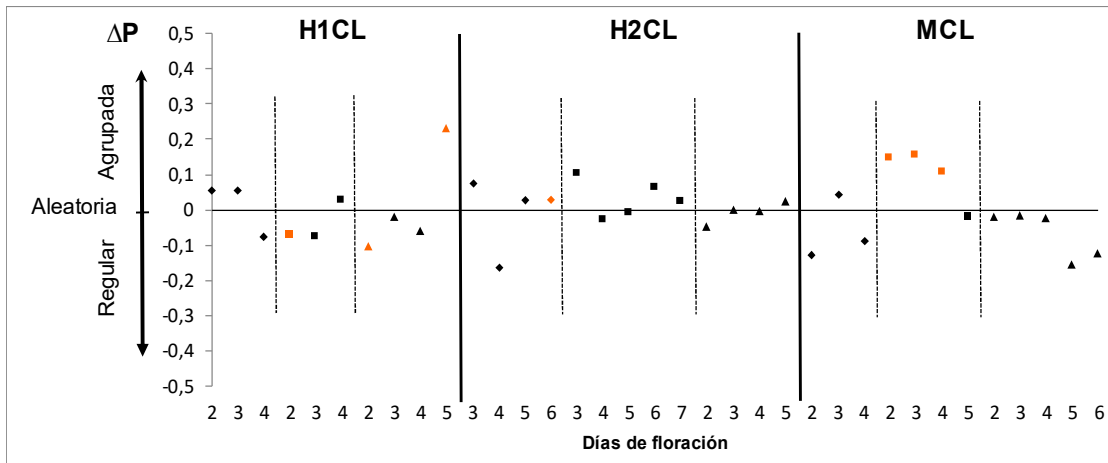


Figura 3.13: ΔP calculado para cada día de floración. \blacklozenge capítulo 1, \blacksquare capítulo 2 y \blacktriangle capítulo 3 de cada genotipo estudiado (H1CL, H2CL y MCL). En negro, ΔP que no resultaron significativamente distintos a cero y corresponden a una distribución Aleatoria. En naranja, ΔP que resultaron significativamente distintos a cero: valores positivos ($\Delta P > 0$) corresponden a una distribución Agrupada y negativos ($\Delta P < 0$) a una Regular.

Teniendo en cuenta estos resultados individuales de los cálculos de distribución de flores secretoras en cada capítulo por genotipo y cada día, y calculando su participación porcentual en el estudio, se puede generalizar que la distribución fue, principalmente, de tipo **aleatoria** ya que alrededor del 70% de los días en que se realizó el muestreo la secreción resultó tener esa distribución (Figura 3.14).

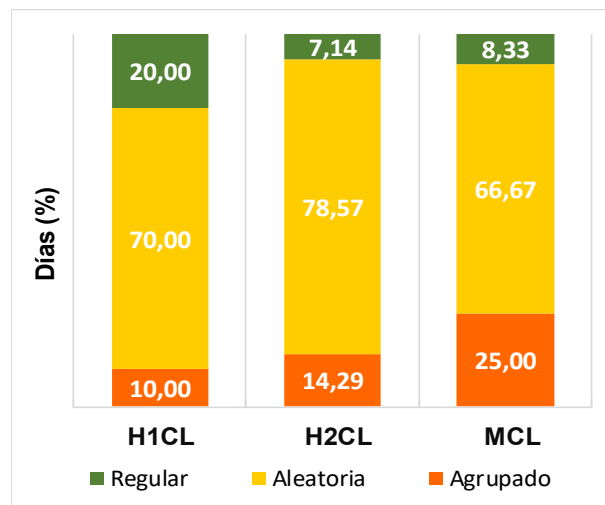


Figura 3.14: Porcentaje de días de floración estudiados en cada genotipo (H1CL, H2CL y MCL) que presentaron distribución aleatoria, regular y agrupada de flores secretoras de néctar.

Esta tendencia se repitió en los tres genotipos y fue corroborada con un test t de comparación de medias con hipótesis nula $\Delta P = 0$. ($H1: p = 0,8867$; $H2: p = 0,3171$ y $M: p = 0,7405$, respectivamente), evidenciando que no existiría un patrón de secreción definido, sino que las flores secretoras se distribuyen al azar.

Por último, se demostró que los sectores en los que se dividió cada capítulo tienen la misma proporción de flores secretoras y no secretoras, lo que se comprobó mediante el test de Chi cuadrado de homogeneidad (Figura 3.15). Estos resultados permiten inferir que no existe una distribución espacial diferencial de la secreción en distintos sectores del capítulo.

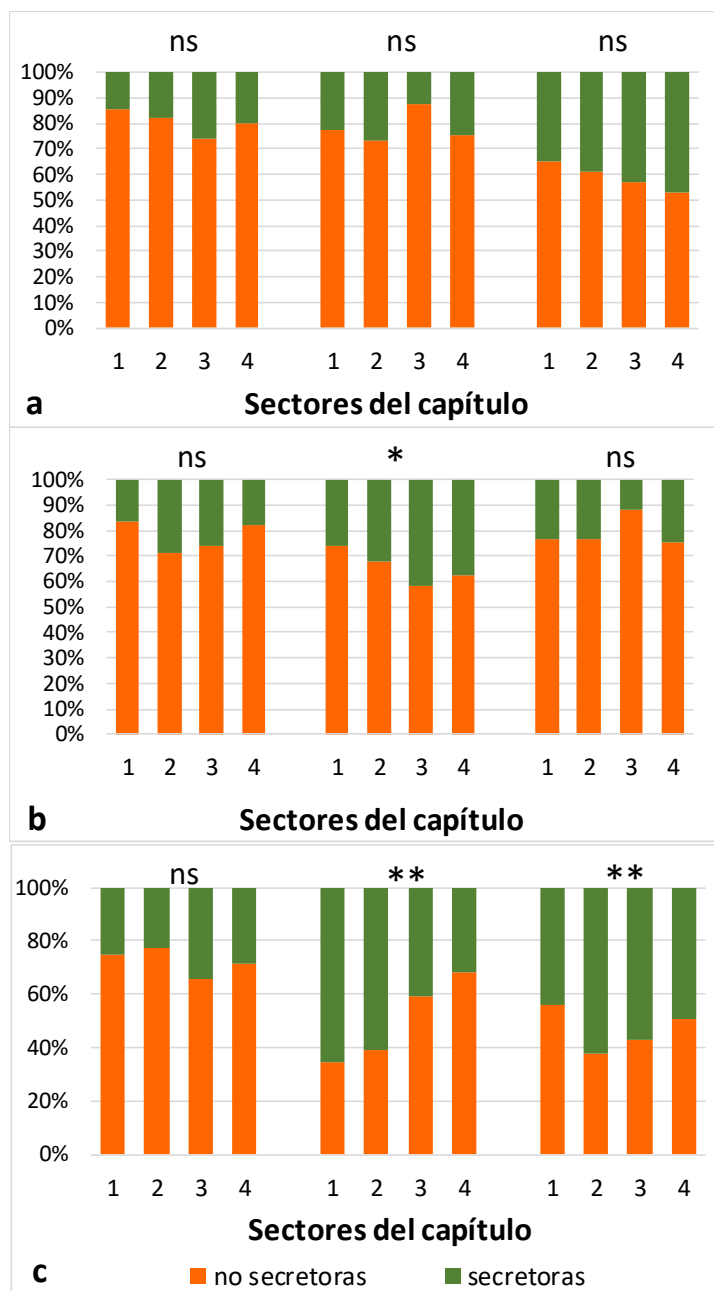


Figura 3.15: Proporción de flores secretoras y no secretoras en los cuatro sectores de cada uno de los tres capítulos muestreados en cada material genético (a:H1CL, b:H2CL y c: MCL). Los símbolos * y ** indican evidencias significativas y altamente significativas, respectivamente, de que los sectores no son homogéneos respecto a la proporción de flores secretoras y no secretoras, con un $p > 0.2$.

Los resultados en el MCL fueron confusos ya que dos de los capítulos muestreados presentaron un efecto debido al sector, sin que ello se viera reflejado en la superioridad de un sector en particular (Figura 3.15). Estos capítulos también mostraron un porcentaje de flores secretoras muy alto en relación a los demás, el cual parece bastante atípico teniendo en cuenta los valores mencionados en la bibliografía encontrada (Sammataro et al., 1984).

Se ha planteado en otras especies con inflorescencias racimosas la presencia de un gradiente en la disminución del volumen de néctar desde las flores inferiores a las superiores, acompañado por el movimiento de abejorros y abejas siguiendo el sentido mencionado. Esto se ha interpretado como una adaptación para alentar a los polinizadores a moverse hacia arriba cuando visitan una inflorescencia, disminuyendo la autopolinización geitonogámica (Fisogni et al., 2011; Zhao y Conner, 2016).

Otros autores plantean distribuciones espaciales de tipo irregular, distribución obtenida a partir de la correlación de la secreción de néctar entre pares de flores vecinas en *Anchusa strigosa* (Shmida y Kadmon, 1991) y *Echium vulgare* (Leiss y Klinkhamer, 2005).

En el caso de este estudio, el hallazgo dentro de la inflorescencia de una distribución aleatoria en la secreción de la recompensa néctar, interpretado en conjunto con la hipótesis de pecoreo de la “recompensa impredecible”, permitiría inferir una reacción por parte del polinizador que derive en pecoreos más cortos por el rechazo a la incertidumbre de la recompensa encontrada (Stephens 1981; Gonzalez Andújar y Fernandez Cancio, 1985). Además, como fue planteado por Bell (1986) la estrategia de las plantas de utilizar estas flores “engañosas” que no producen néctar pero que son igualmente visitadas, se maximiza en flores que no tienen los nectarios expuestos, en las cuales los insectos se ven obligados a generar un contacto más estrecho en la búsqueda activa de la recompensa. De esta manera, sería ventajoso para el sistema este tipo de secreción de la inflorescencia, ya que aseguraría un movimiento de polinizadores entre plantas muy beneficioso para la dispersión de polen. En tal sentido, otros investigadores argumentan que la variabilidad del néctar puede ser adaptativa porque los polinizadores que encuentran recompensas variables tienen más probabilidades de moverse de una planta a otra, promoviendo el cruzamiento (Nepi, 2007).

Si bien no se ha encontrado bibliografía referente a la distribución espacial de la secreción de néctar en el capítulo de girasol, o al menos de otras especies con este tipo de inflorescencia que apoye la distribución aleatoria encontrada en los tres genotipos bajo análisis, este estudio podría ser muy importante para abrir el camino que amplíe la interpretación de cómo opera esta recompensa en una inflorescencia compleja que funciona como una unidad atractiva. Si bien, los numerosos estudios científicos encontrados sobre la secreción de néctar por flor brindan una importante fuente de información que permite caracterizar la naturaleza genotípica y fenotípica de esta recompensa, no se cuenta con

muchos estudios que incluyan una mirada holística del sistema (Roy, 2017), lo cual permitiría interpretar el rol de esta secreción en la relación ecosistémica planta-polinizador y poder utilizar esa información para potenciar la producción de semilla.

3.5 CONCLUSIONES

- Se encontró una secreción diferencial de néctar en los distintos genotipos estudiados.
- Las diferencias en los parámetros asociados a la cantidad de néctar secretado no estarían relacionadas al evento tecnológico que fue introducido por mejoramiento genético de los parentales ni al sexo de los mismos.
- El néctar total secretado por las líneas estudiadas resulta de un balance entre la cantidad de flores secretoras y la cantidad de néctar que secretó cada flor, siendo esta relación diferente en los distintos genotipos analizados.
- La comparación entre los genotipos mostró que a menor cantidad de néctar secretado fue mayor su concentración, relación que se confirmó en el análisis multivariado a través de una correlación significativa y negativa entre estos parámetros.
- Los parámetros asociados a la cantidad de néctar secretado estuvieron más relacionados al componente genético que al ambiental (determinado por el factor "día de muestreo"). Por el contrario, en los vinculados a la cantidad de azúcar, esta relación se dio a la inversa.
- Si bien la cantidad absoluta de néctar medida en los parentales H1CL, H2CL y MCL en situación real de producción y en invernáculo no fue la misma, la relación entre los genotipos se mantuvo en ambas condiciones, mostrando la influencia del factor genético en la cantidad de néctar secretado.
- La distribución de las flores secretoras dentro del capítulo resultó, en general, aleatoria y se repitió en los tres genotipos estudiados. La misma resultó independiente del estadio de floración en que se encontraban las inflorescencias y del sector muestreado.

CAPÍTULO 4: ESTUDIOS DEL POLEN

4.1 INTRODUCCIÓN

En las Angiospermas, el polen es el conjunto de células producidas en los estambres que contienen a las gametas masculinas (por lo tanto, constituyen el gametofito masculino) y las trasladan hasta el óvulo que, a su vez, contiene el saco embrionario (gametofito femenino).

Cada grano de polen es muy resistente debido a las capas que lo protegen. La más externa, la exina, está compuesta por una intrincada matriz de un complejo carbohidrato denominado esporopolenina. Esta capa, que puede presentar diversas ornamentaciones utilizadas por la taxonomía para clasificar e identificar grupos vegetales, puede estar interrumpida de forma regular o irregular, definiendo así diversos tipos de aperturas, que también tienen valor sistemático. La pared interna, llamada intina, compuesta principalmente de celulosa y pectina (Erdtman, 1966; Heslop-Harrison, 1971), forma el tubo polínico que se desarrolla al momento de la germinación del grano de polen (Heslop-Harrison, 1987).

Si bien para fecundar el óvulo hace falta un solo grano de polen, la existencia de diversos tipos de fallas que interfieren en este proceso hacen necesaria la producción y dispersión de un gran número de granos de polen, el cual varía según la especie (Godini, 1981; Hidalgo et al., 1996; Silva et al., 2016). Sumado a esto, en especies de polinización entomófila, el polen no sólo cumple con la función reproductiva, sino que, además, atrae a los polinizadores. Éstos, en busca de alimento, cumplirán el rol de vectores. Esto plantea una paradoja para las plantas dependientes de la polinización entomófila ya que, si bien el polen necesariamente debe ser colectado por los insectos para realizar esta función, resulta un gasto energético cuando el mismo no alcanza los estigmas (Hargreaves et al., 2009). Para que este costo se justifique y poder asegurar el éxito reproductivo, la planta debe producir una cantidad adecuada de granos de polen por flor, los que deben poseer capacidad para germinar y hacer llegar hasta el óvulo los anterozoides para cumplir con su función.

En relación a la cantidad de polen producido por las distintas especies vegetales, Cruden (2000) expone que varía en relación a distintos factores, entre los que menciona a la sexualidad de las plantas (monoicas o dioicas) y el tipo de polinización que requieren (entomófila o anemófila), siendo necesaria una mayor cantidad de granos de polen/flor en especies dioicas y de polinización anemófila. Este autor, además, relaciona este parámetro con las características propias del polen y del pistilo destinado a recibirlo. En cuanto a su tamaño y forma de liberación, así como a su rol como recompensa floral, resulta necesaria una producción abundante de granos cuando el polen es la única recompensa ofrecida. En

el caso de las características del pistilo, menciona una relación negativa de la cantidad de polen/flor con el área del estigma y el tiempo de permanencia en estado receptivo del mismo y una relación positiva con la longitud del estilo.

Las relaciones mencionadas forman parte de las estrategias que cada especie vegetal fue adquiriendo a través de un largo proceso evolutivo con el fin de mejorar su eficiencia reproductiva. En tal sentido, algunos estudios muestran que la cantidad de polen producido determina la producción de frutos (Godinni, 1981; Byers, 1995; Cunningham, 1995; Baskin y Baskin, 2018), siendo éste el resultado deseado para la propagación y perpetuación de una especie vegetal en el tiempo y por quienes la utilizan con fines productivos.

Existen diversas técnicas para la cuantificación de la producción de polen (Dafni et al., 2005). Entre ellas, el Hemocitómetro o cámara de Neubauer se presenta como una herramienta muy eficiente, cuyo uso data de muchos años de antigüedad (Oberle y Goertzen, 1952; Maêda, 1985) pero se continúa utilizando en la actualidad (Tourn, 2010; Astiz y Hernández, 2014; Pinheiro-Costa et al, 2018).

La germinabilidad del polen es otro parámetro de gran importancia para la producción de frutos, tanto para los productores (empresas y particulares) como para los prestadores de servicios de polinización. En el primer caso, en pos de la mejora de la productividad. En cuanto a los servicios de polinización, en general, se exige a los apicultores el cumplimiento de reglas muy estrictas de movimiento de colmenas para evitar posibles contaminaciones con polen indeseable, aún sin saber fehacientemente si el polen que podrían tener las colmenas en su interior conserva su capacidad de germinar (comunicación personal con integrantes de la CAP).

Muchos autores han estudiado los efectos de la humedad relativa, la temperatura y la radiación en la viabilidad y germinabilidad del polen de diversas especies (Stone et al., 1995; Güçlü y Koyuncu, 2017; Hebbar et al, 2018; Çetinbaş-Genç et al, 2019).

El efecto que produce en la germinabilidad la alta o baja humedad relativa se asocia a la humedad propia del polen en la anthesis (Nepi et al., 2001). Por lo general, los granos de polen con mayor contenido de agua son más sensibles a la baja humedad relativa (HR) en el medio ambiente porque pierden agua más rápidamente. En tales especies intolerantes a la desecación, se cree que la pérdida de agua conduce a cambios irreversibles en las membranas del polen (Bots y Mariani, 2005). Uno de los factores que están más íntimamente relacionados a la humedad inicial y el efecto de la humedad ambiente es el tipo de carbohidrato de reserva que contenga el polen, que varía entre las especies vegetales (Pacini, 1996).

Los efectos de la temperatura son muy variables según la especie. En algunas, los efectos del calor generan daños notorios en la germinabilidad (Aloni et al., 2001; Pressman et al., 2002), en otras especies, las altas temperaturas fueron perjudiciales cuando se combinaron con alta HR (Shivanna y Heslop-Harrison, 1981) y en otros casos se debieron aplicar temperaturas extremas para que se manifieste un daño, las cuales no son posibles en condiciones naturales (Rao et al., 1991; Sato et al., 2002;). Además, existen estudios que demostraron efectos tanto de las altas como las bajas temperaturas durante el desarrollo del polen (Issarakraisila y Considine, 1994).

En cuanto a los efectos climáticos en el polen de girasol, se han encontrado muy pocos autores que los mencionan (DeGrandi-Hoffman y Chambers, 2006; Razzaq et al., 2015). En general, estos trabajos se realizaron con germoplasmas híbridos, por lo que aún menos se conoce de germinabilidad del polen de las líneas parentales, tipo de producción en el cual no existe ninguna posibilidad de autopolinización, por lo que resulta fundamental la cantidad y calidad de polen que llega a las líneas androestériles.

Si bien existen diversas técnicas para evaluar la viabilidad y la germinabilidad del polen (Hauser y Morrison, 1964; Alexander, 1980; Dafni, 1992; Ferreira et al., 2009; Araméndiz-Tatis et al., 2013; Krudnak et al., 2013), estos parámetros relacionados al éxito reproductivo son diferentes e involucran procesos fisiológicos distintos. Las tinciones vivas, si bien son más rápidas y sencillas, han demostrado en diversos estudios teñir tanto granos vivos como muertos, lo que podría dar una sobreestimación de la viabilidad (Rodríguez-Riano y Dafni, 2000; Bots y Mariani, 2005;). Por ejemplo, esto fue discutido por Barrow (1983) para el método de Alexander (1980), donde su observación de esta tinción indiferenciada lo llevó a concluir que esta técnica no sería útil para determinar la viabilidad sino para diferenciar granos abortados de no abortados o maduros de inmaduros. Además, aun cuando este parámetro esté bien representado, podría no reflejar acertadamente la capacidad de los granos de polen de germinar y llegar al óvulo (Barrow, 1983). Las soluciones utilizadas para evaluar la germinabilidad (Todorova et al., 2004; Astiz, 2012; Bhowmik y Bhadra, 2015), si bien no logran imitar de manera exacta el microclima que el estigma ofrece, brindan un dato más aproximado de la fertilidad potencial del polen que las tinciones vivas (Bots y Mariani, 2005).

Algunas especies pueden presentar muchas limitaciones para germinar en soluciones artificiales, pero dentro de las probadas, las que contienen polietilenglicol han presentado mejores resultados, ya que al ser una sustancia relativamente inerte metabólicamente para el polen y no poder ingresar a las células, brinda un medio más estable que las soluciones que contienen únicamente sacarosa y evita la rotura del tubo polínico (Taylor y Hepler, 1997).

Se puede observar en los distintos trabajos de los autores citados que, desde las últimas décadas del siglo XX, se ha estudiado la capacidad potencial del polen para germinar y la mejor manera de evaluar este parámetro en condiciones de laboratorio. En cambio, no existen muchos estudios que evalúen el polen a campo o que realicen la toma de muestras en condiciones de producción real (Bots y Mariani, 2005; Razzak et al., 2015), dada la complejidad que tiene su incubación y observación dependiente de ciertos elementos propios del laboratorio, como es el caso del microscopio óptico.

Como fue mencionado al principio, varios aspectos relacionados a la producción y transporte del polen definen el éxito reproductivo de una especie vegetal. En este último factor es donde entran en juego los polinizadores, quienes con el objetivo de alimentarse, se aproximarán a las flores en búsqueda de polen y/o néctar. Es en esta acción cuando se llenarán de polen y lo transportarán asistiendo a la reproducción de las especies vegetales que lo requieran. Entre los visitantes florales más frecuentes se menciona a la abeja melífera, la que se ubica como el insecto más eficiente para llevar a cabo la polinización de un amplio espectro de cultivos agrícolas (Seeley, 1985).

La abeja, al retirar el polen de la flor, lo humedece con néctar o miel formando una masa (llamada carga corbicular) que luego transporta en el tercer par de patas (Roulston y Cane, 2000; Thorp, 2000). La capacidad de poder compactar el polen en la corbícula va a estar relacionada al contenido de humedad del mismo (van Praagh y Brinkschmidt, 1987), la presencia de pollenkitt (Stanley y Linskens, 1974) y las características morfológicas externas de su cubierta (Vaissiere y Vinson, 1994).

El polen es la principal fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales en la dieta de las abejas. La cantidad y calidad de polen recolectado afecta su reproducción, cría, longevidad y, por ende, la productividad de la colonia (Kleinschmidt y Kondos, 1978; Di Pasquale, 2016). Según Nicolson y Human (2013) el aporte de esta recompensa es aún más crítico que el de néctar porque cubre las necesidades nutricionales de las abejas en desarrollo (larvas y adultos) en cuanto a los elementos nutricionales mencionados.

Las abejas pecoreadoras, colectan polen de una amplia gama de fuentes florales y tienen preferencia por algunas especies vegetales por sobre otras (Montenegro et al., 1992; Cook et al., 2003; Lau et al., 2019). Aunque está claro que las abejas melíferas pueden distinguir entre distintos tipos de polen, la forma en que lo hacen es poco conocida (Pernal y Currie, 2001).

El contenido de proteínas del polen varía de 2,5 a 61 % de proteína bruta (PB) entre las diferentes especies de plantas y regiones donde se desarrollan (Roulston et al., 2000). La cantidad relativa de este nutriente es considerada por muchos autores como el principal factor que influye en la preferencia del polen por las abejas (Louveaux, 1958; Schmidt y

Johnson, 1984; Ghosh et al., 2020). Fewel y Winston (1992), además de reafirmar la selección por contenido de proteínas, lo relacionan con los niveles de almacenamiento de la colmena y los requisitos de la cría. Sin embargo, otros investigadores no encontraron evidencias de esta relación (Van der Moezel et al., 1987; Roulston et al. 2000).

Con respecto a las reservas lipídicas, las mismas están presentes en los esferosomas en el citoplasma del grano de polen maduro y en desarrollo. Es un tipo de reserva energética asociada, en general, a granos de tamaño grande (Baker y Baker, 1982) y que son dispersados por insectos (Franchi et al., 1996). Otra fuente importante de lípidos se encuentra en el exterior del polen, en aquellos que poseen pollenkitt (Manning, 2001). Algunos autores estudiaron los perfiles lipídicos del exterior e interior del polen, encontrando que, muchas veces, los ácidos grasos que contiene el pollenkitt son diferentes a los del interior (Evans et al., 1987; Piffanelli et al., 1998), lo que aporta valor nutricional al polen consumido.

Los lípidos son importantes para las abejas principalmente como fuente de energía, algunos componentes de lípidos están involucrados en la síntesis de reserva de grasa y glucógeno, y también como parte de la estructura de las membranas celulares (Graham, 1992). Además, muchas sustancias aromáticas que atraen a los insectos y otras que tienen efecto antimicrobiano son transportados principalmente en los lípidos del polen (Manning, 2001).

En cada uno de sus viajes de pecoreo, la abeja visita mayoritariamente una determinada fuente de polen (Waddington y Holden, 1979), por lo que cada carga corbicular generalmente es mono-específica y tiene características distintivas de color, textura, etc. que permiten su clasificación para el conocimiento de la flora polínica utilizada (O'Neal y Waller, 1984; Montenegro et al., 1992; Dimou et al., 2006). Para asistir al estudio de dicha flora se utilizan las trampas caza polen, que son colocadas en la entrada de la colmena y permiten coleccionar las cargas que se desprenden de las corbículas de las abejas cuando éstas las atraviesan (Louveaux, 1958). Esta herramienta es muy importante para analizar las preferencias de *A. mellifera* en la recolección de esta recompensa y evaluar (de manera parcial, ya que el polen es uno de sus recursos alimenticios, pero no el único) la atraktividad que el cultivo posee con respecto a la flora acompañante y sus potenciales efectos en la polinización.

Las flores tubulosas del girasol poseen anteras tetraesporangiadas. Las mismas cuentan con cuatro capas desde el exterior al interior: epidermis, endotecio, capa media y tapete. El tapete, compuesto por una capa simple, es de tipo plasmodial o ameboide, ya que se degrada y pierde su estructura, volcando su contenido citoplasmático en el lóculo y aportando a la nutrición del polen en su proceso de formación (Çetinbaş y Ünal, 2015). Estas

células del tapete, además están relacionadas a varias etapas de la formación de los granos de polen como, por ejemplo, la producción de precursores de la exina y son las que determinan la presencia de pollenkitt en esta especie (Pacini, 2000). Esta sustancia tiene la función fundamental de aumentar la adhesión (Lin et al., 2013) que le permitirá al polen viajar en el cuerpo de los insectos, además de facilitar la fijación al estigma y la germinación del grano de polen cuando éste llegue a destino (Sharma y Bhatla, 2013).

El requerimiento de polinización entomófila por parte de esta oleaginosa se relaciona directamente con la morfología del grano de polen. La superficie de la esporodermis es equinada, lo que facilita su transporte por insectos (Schneiter, 1997). Ya en 1940, Putt observó que este polen se transportaba en grupos de 5 o más granos y esto hacía imposible su traslado por el viento.

El polen del girasol ha sido mencionado por muchos autores como un polen poco atractivo para los polinizadores por sus características nutricionales (Schmidt et al., 1995; Pernal y Currie, 2000; Somerville y Nicol, 2006; Tasei y Aupinel, 2008; Nicholson y Human, 2013) lo que puede influir en el pecoreo de la abeja y, por ende, en el traslado que ésta hace del mismo a lo largo y ancho del lote de producción de semilla. Algunos autores sugieren que las abejas que sólo obtienen polen de girasol como fuente de alimento pueden sufrir estrés nutricional dando como resultado una reducida supervivencia (Schmidt et al., 1995), mientras que la recolección de polen de diferentes especies asegura una dieta variada más satisfactoria para el desarrollo de la colmena (Louveaux, 1968).

El estudio de la dinámica de producción de polen en lotes de producción de semilla híbrida de girasol, así como su germinabilidad, y el conocimiento de la flora polinífera que puede competir con el cultivo, pueden aportar información importante para brindar estrategias de manejo tanto de las líneas androfértiles como de las colmenas utilizadas en el servicio de polinización.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la dinámica de producción de polen de tres líneas androfértiles de girasol
- Evaluar la estabilidad genética de la producción de polen
- Cuantificar la germinabilidad del polen en una línea androfértil y su variación dentro y entre días en relación a las variables climáticas registradas
- Caracterizar las cargas corbiculares de los parentales androfértiles de girasol estudiados
- Evaluar la colección de polen de girasol por parte de *A. mellifera* frente a otras especies en floración disponibles.

4.3 ESTUDIOS DEL POLEN FLORAL

4.3.1 Producción intracapítulo de granos de polen/flor

4.3.1.1 Materiales y métodos

Se evaluó la producción de polen y su variabilidad según la ubicación de las flores en tres sectores del capítulo (sector externo: SE, sector medio: SM y sector interno: SI) en los materiales androfértiles estudiados (M, MCL y MAO; Tabla 2.1). Para esto, se seleccionaron en cada línea, 5 capítulos en cada uno de los siguientes EF: R5.2, R5.5 y R5.8 (Figura 4.1).



Figura 4.1: Capítulos de girasol en estadios R5.2, R5.5 y R5.8.

Luego, de cada uno de éstos, se colectaron tres flores de la hilera contigua a las abiertas ese día, es decir, la línea que abriría al día siguiente (por lo cual tenían la corola aún cerrada), las que se conservaron en tubos eppendorf con ácido acético glacial rotulados con la información del parental y número de capítulo correspondiente. Posteriormente, en el laboratorio, se procedió a ubicar cada flor en un tubo de vidrio graduado donde fue estrujada con una varilla de vidrio para liberar el polen de las anteras cuidando de no romper los granos por fricción. Se agregó a cada tubo 0,2 mL de solución de glicerina y agua destilada (1:1), enjuagando la varilla de vidrio para no perder granos de polen durante el proceso. Se agitó con Vortex durante 5 minutos inicialmente para despegar los granos de polen y luego durante 2 minutos más antes de tomar cada una de las tres alícuotas utilizadas para realizar el conteo. El mismo se realizó utilizando una cámara de Neubauer o Hemocitómetro (Figura 4.2) que permitió contar el número de granos de polen de la muestra y referenciarlo a un volumen conocido de manera de estimar el número de *Granos de polen/flor* (GPF) (Dafni et al., 2005; Tourn et al., 2010). Este procedimiento se realizó también con flores tomadas del material androfértil MCL de la campaña 2015 (MCL₂₀₁₅) con el fin de evaluar si existía estabilidad en la producción polínica de dicho germoplasma en dos años, sitios y tipos de producción distintos (Tabla 2.1).

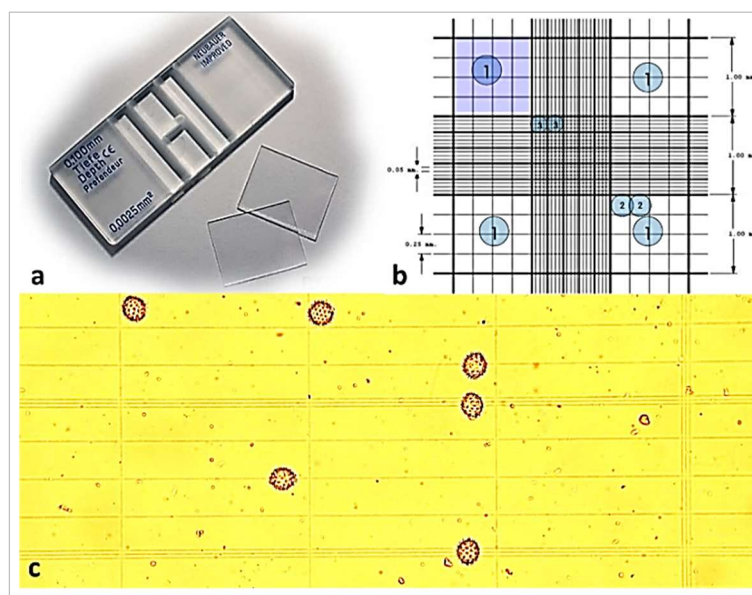


Figura 4.2 a: Cámara de Neubauer. b: Medidas del área de conteo de los 9 cuadrantes de una hemicámara. c: Granos de polen de girasol en cámara de Neubauer.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2008). Los materiales M y MCL (que tenían como factor común el sitio y año de producción) y las líneas MCL y MCL₂₀₁₅ (que compartían tecnología) se analizaron a través de un ANOVA doble anidado evaluando al mismo tiempo el efecto del genotipo, sector del capítulo y su posible interacción. La comparación de los sectores dentro del capítulo de los materiales AO se analizó por separado utilizando un ANOVA simple por haber sido muestreados en distinto año y sitio. Las comparaciones entre medias se realizaron con el test LSD de Fisher con un nivel de significación del 0,05.

4.3.1.2 Resultados y discusión

La cantidad y calidad del polen de girasol que llega al estigma de cada flor tiene un efecto directo sobre la cantidad de frutos cuajados, su peso y contenido de aceite (Chamer et al., 2015). Por esta razón, es fundamental conocer el nivel de producción de polen y su continuidad desde el comienzo hasta el final del período de floración de los capítulos.

A partir de los valores de *GPF* determinados por sectores en este estudio (Figura 4.3) se determinó que el número de *GPF* promedio fue cercano a 15.000. Si bien es escasa la bibliografía encontrada respecto a este parámetro en líneas androfértiles, trabajos anteriores presentaron promedios similares (Bonjour et al., 2013) mientras que otros autores encontraron valores superiores, como Vear et al. (1990), que mencionan un promedio entre 25.000 y 40.000.

El material MCL resultó superior a M en la cantidad de *GPF* ($F_{2,60} = 13,46$; $p = 0,0012$). Con respecto a la variación de este parámetro entre los sectores del capítulo, el promedio de *GPF* presentó una tendencia centrípeta creciente en los capítulos de los parentales M y

MCL (Figura 4.3). Esta similitud en la tendencia se manifestó en la prueba de interacción entre los genotipos y sectores, la cual resultó no significativa ($F_{2,60} = 1,37$; $p = 0,2748$). En el mismo sentido, el ANOVA doble particionado por mejora genética mostró que la cantidad de *GPF* fue significativamente superior en el sector interno de los capítulos de M ($F_{2,14} = 8,96$; $p = 0,0042$, Figura 4.3 a) y de MCL ($F_{2,14} = 7,48$; $p = 0,0078$; Figura 4.3 b).

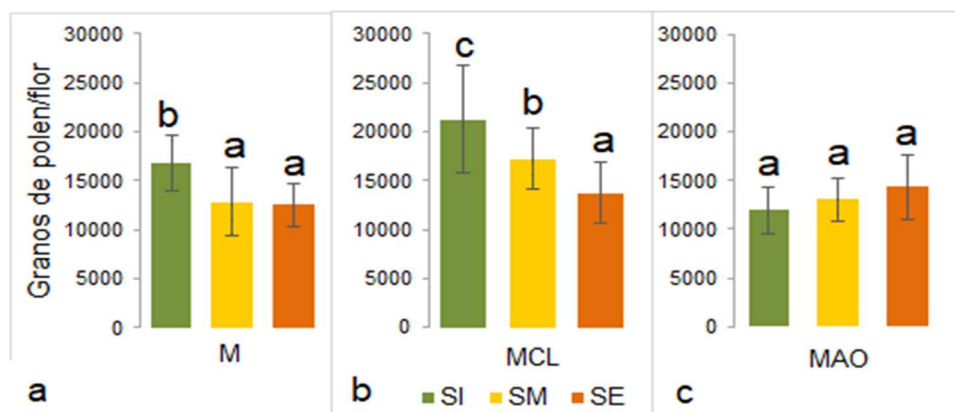


Figura 4.3: Valores promedio de granos de polen/flor de los genotipos M, MCL y MAO para los sectores interno (SI), medio (SM) y externo (SE) del capítulo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

En el caso de los *GPF* determinados en el MAO, no se encontraron diferencias significativas entre los tres sectores del capítulo ($F_{2,30} = 2,92$; $p = 0,0924$; Figura 4.3 c).

El gradiente creciente centrípeto observado en los materiales M y MCL (Figura 4.3) sería coincidente con lo hallado por Astiz (2012) para los híbridos de su estudio. La autora lo atribuyó a un ritmo de microsporogénesis mayor en las flores centrales que en las periféricas y a un gradiente que decrece centrípetamente tanto en la concentración de ácido giberélico como en la viabilidad del polen. Este tipo de gradiente permitiría mantener una producción más estable durante toda la floración del capítulo manteniendo el costo energético, ya que, en el momento de mayor cantidad de flores en anthesis, la producción de polen de cada una de ellas sería menor y viceversa. Por el contrario, Caramuti et al. (2000) encontraron que el sector periférico fue el que presentó mayor número de *GPF* que el medio y el central, trabajo que también fue realizado en genotipos híbridos.

Los resultados aquí presentados son originales ya que no se han hallado otros antecedentes en la bibliografía disponible que estudien la existencia de un gradiente de producción polínica en capítulos de líneas parentales de girasol. Los mismos no han permitido establecer con contundencia, en las tres líneas macho, la existencia del gradiente mencionado en los híbridos. En este contexto, este parámetro debería ser estudiado en otros genotipos y sería importante profundizar en el efecto de interferencia que pudieran ejercer en este proceso los eventos tecnológicos. Centrándonos en el rol del polen como recompensa primaria, determinar la dinámica de su producción y el consecuente efecto en

la atractividad durante todo el período de floración del capítulo, permitiría entender su efecto en la polinización.

En la evaluación del material MCL en distintos años y sitios de muestreo, se observa la misma tendencia. No se hallaron diferencias significativas en la comparación entre años ($F_{1,59} = 3,53$; $p = 0,0724$), aunque sí entre los sectores del capítulo, siendo menor el promedio de *GPF* en el sector externo y no encontrándose diferencia, entre el sector medio y el interior del capítulo ($F_{2,59} = 8,94$; $p = 0,0013$). Por último, como la interacción entre estos dos factores estudiados también resultó no significativa ($F_{2,59} = 1,11$; $p = 0,3440$), se puede inferir que el material presentó el mismo comportamiento con respecto a la cantidad de *GPF* por sector en los dos años y sitios de muestreo (Figura 4.4).

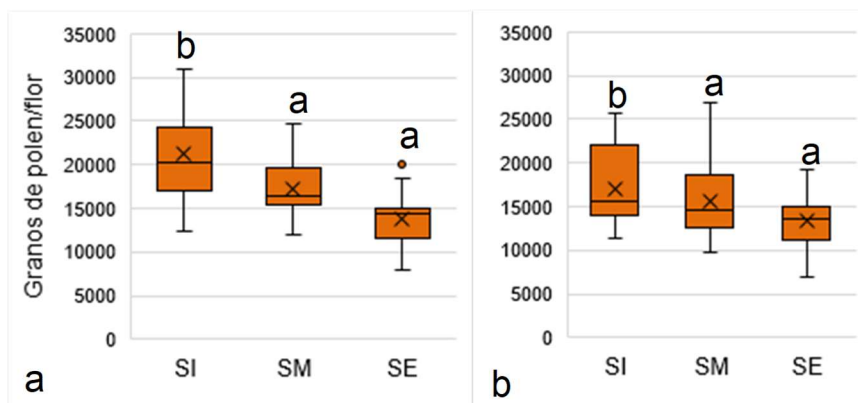


Figura 4.4: Gráficos de cajas y brazos para el material MCL en sus dos años de muestreo: a, 2014 y b, 2015. Las cruces indican la mediana de Granos de polen/flor de los sectores interno (SI), medio (SM) y externo (SE) de los capítulos. Los brazos indican cuartiles Q1 y Q3, inferior y superior, respectivamente.

La estabilidad observada entre años permite inferir que este parámetro estaría más influenciado por el genotipo que por el ambiente. Este hecho fue planteado en 1975 por Hinata y Konno para la familia Brassicaceae y por Vogler et al. en 1999 para la especie *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae). Con respecto al girasol, Vear et al. (1990) observaron una marcada relación entre la producción de polen y el factor genético en un estudio donde evaluó este parámetro en líneas parentales y sus descendencias híbridas. Si bien sus resultados muestran una promisoría factibilidad de seleccionar por este carácter (alta heredabilidad en la producción de polen), encontraron una variabilidad muy importante entre plantas dentro de cada genotipo, lo que dificultó algunas conclusiones.

4.3.2 Germinabilidad del polen

4.3.2.1 Materiales y métodos

Los materiales utilizados fueron sembrados en una parcela experimental en el predio del Departamento de Agronomía, UNS (Tabla 2.1). La semilla cedida por la empresa multiplicadora TecnoSeeds sólo permitió obtener plantas del material androfértil MCL ya que

la del material tradicional no fue viable. Se utilizaron sensores Hobo que registraron los datos climáticos con una frecuencia de 5 minutos durante el período de floración.

Una vez comenzada la floración de los capítulos, durante tres días consecutivos, se tomaron a las 7, 10 y 14 h, muestras de polen de varias flores de tres plantas en plena antesis. Con la elección de estos horarios se propuso evaluar el porcentaje de germinabilidad del polen desde su liberación de las anteras y durante el período de mayor exposición a altas temperaturas y baja humedad relativa del día. Las muestras, que fueron tomadas en tubos eppendorf cerrados y rotulados, se transportaron desde el campo experimental al laboratorio en una conservadora con hielo para evitar que diferentes temperaturas en el lapso entre extracción y procesamiento de cada muestra influyan sobre los resultados. Una vez en el laboratorio, siguiendo el protocolo de incubación por gota invertida (Shivanna y Cresti, 1989), se colocó el polen y una gota de solución nutritiva (Astiz, 2012) sobre un portaobjetos que se invirtió e incubó durante 2 h en cámara húmeda a 25°C (Figura 4.5, a). Luego, utilizando microscopía óptica, se contabilizó el porcentaje de *Germinabilidad del polen* (GP, %) en tres repeticiones en campos distintos, contando un total de 100 granos en cada una de ellas. Los granos que se consideraron germinados fueron aquellos con el tubo polínico elongado y visible (Figura 4.5, b).



Figura 4.5 a: Estufa con cámara húmeda en su interior. b: Grano de polen de girasol con el tubo polínico elongado. c: Portaobjetos con solución germinativa y polen.

Por otro lado, con el fin de analizar el comportamiento de la GP en relación con las variables climáticas, se realizó el muestreo al azar de un capítulo en estadio R5.5 a las 12 h cada día, durante 17 días. Las variables climáticas que se analizaron junto a la GP fueron: humedad relativa (HR) media, máxima y mínima, temperatura (T°) media, máxima y mínima

y la Amplitud térmica (AT), es decir, la diferencia entre la temperatura mínima y la máxima registrada desde la apertura de la flor hasta la hora en la que se tomó la muestra. Los datos fueron sometidos a un análisis multivariado de Componentes principales.

4.3.2.2 Resultados y discusión

Los valores de GP obtenidos (Figura 4.6) en los granos de polen en los tres horarios y tres días muestreados oscilaron entre valores muy bajos (entre 5 y 25 %), coincidentemente con los observados por otros autores para girasol. Todorova et al. (2004) informaron valores de GP entre 13 y 53 % en seis híbridos. En un trabajo posterior en 2015, Razzak et al. estudiaron diez híbridos obteniendo valores de GP entre 14 % y 57 % en primavera y entre 17 % y 71 % en otoño. Los datos hallados en este trabajo no se pudieron cotejar con bibliografía que haya estudiado líneas parentales androfértiles, por lo cual queda el interrogante de la comparación entre esos tipos de líneas.

Varias hipótesis se plantean para explicar estos bajos porcentajes observados: 1) las características del grano de polen del girasol, que se libera con sólo dos núcleos diferenciados (un núcleo vegetativo y un núcleo generativo). Según Todorova et al. (2004), las angiospermas que poseen ese número de núcleos pierden viabilidad muy rápidamente y apenas pueden germinar en medios artificiales; 2) la secreción de ciertas sustancias por el estigma, ausentes en las soluciones de germinabilidad. Si bien algunos autores clasificaron al girasol como una especie de estigma seco, es decir, que no secreta sustancias relacionadas a la adhesión y germinación del polen (Vithanage y Knox, 1977; Gotelli et al., 2010), posteriormente Sharma y Bhatla (2013), informaron la existencia de secreciones lipídicas en la base de las papilas estigmáticas; y 3) algunos autores relacionan los distintos porcentajes de germinabilidad observados con características propias de cada genotipo (Todorova et al., 2004; Degrandi-Hoffman y Chambers, 2006). En el presente trabajo, este último supuesto no pudo estudiarse ya que únicamente se contó con semilla viable del material MCL, y no pudo realizarse la comparación entre genotipos.

Al analizar la GP entre los horarios muestreados, no se hallaron diferencias significativas, ni se observó una relación clara con la T° y la HR dentro de cada día. Posiblemente, esta relación no se manifestó porque los valores registrados se encontraron dentro de los citados como tolerables para el polen de girasol (Kalyar, 2013, citado por Kalyar et al., 2014) o bien, los períodos de tiempo de exposición a tales factores no fueron lo suficientemente prolongados como para afectar la GP. En tal sentido, Bots y Mariani (2005) mencionan que el estrés térmico en general causa mayores daños en los momentos de maduración del polen que en la liberación del mismo.

Si bien no resultó estadísticamente significativa, se observó una disminución notoria en la germinabilidad a las 14 h del tercer día, donde se registró la temperatura más alta (cerca a 40 °C). Estos resultados indican que el polen no perdió Germinabilidad de manera significativa a lo largo del día, aunque temperaturas superiores a 40 °C podrían tener un efecto negativo.

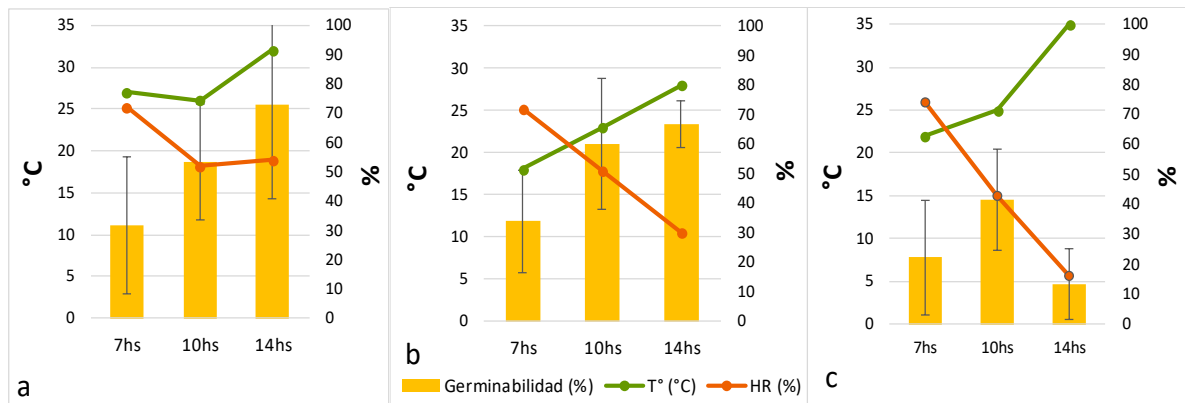


Figura 4.6: Germinabilidad del polen (%) en el parental androfértil MCL y variables ambientales T° (Temperatura, °C) y HR (Humedad relativa, %). Días 1 (a), 2 (b) y 3 (c) de muestreo en el horario de las 7, 10 y 14 h.

En la Figura 4.7 se observa la relación entre la GP y las variables climáticas registradas a través de un análisis de Componentes Principales, donde las componentes 1 y 2 en conjunto lograron explicar el 73.6 % de la variación total.

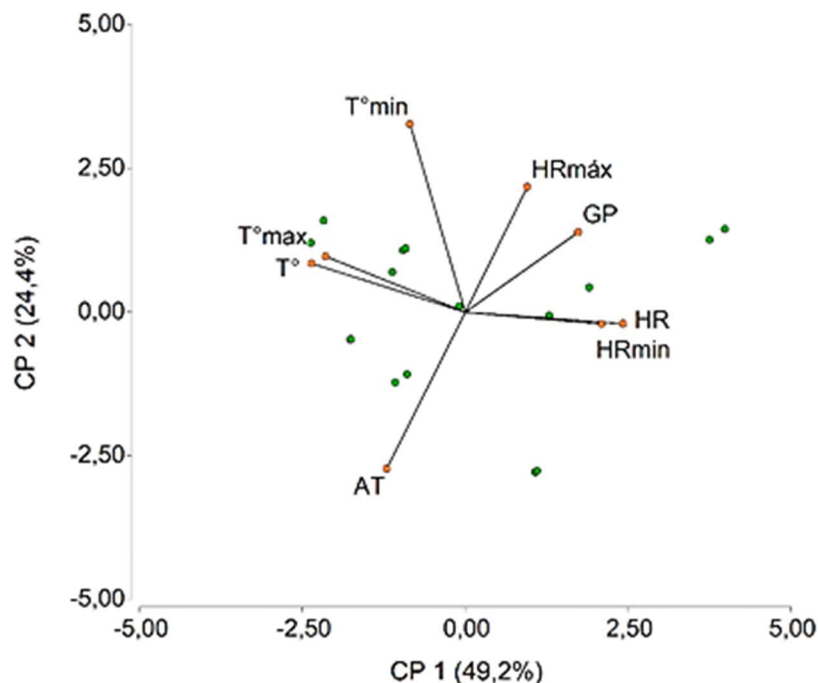


Figura 4.7: Análisis de componentes principales que relaciona las variables climáticas humedad relativa media (HR), máxima (HRmáx) y mínima (HRmin), temperatura media (T°), máxima (T°máx) y mínima (T°min) y Amplitud térmica (AT) con el % de Germinabilidad del polen (GP).

Durante el período estudiado, las tablas y las matrices de coeficientes de correlación y probabilidades muestran una fuerte relación negativa entre la GP y la T°, principalmente con la AT ($p = 0,025$, Coef. = $-0,5569$) y la T°máx ($p = 0,022$, Coef. = $-0,5671$) (Tabla 4.1).

Por otra parte, si bien no resultaron significativas, se puede observar en el Biplot una relación positiva de la GP con la HR, principalmente con la Humedad relativa máxima ($p = 0,0863$, Coef. = $0,4422$).

Tabla 4.1: Coeficientes de correlación (sector inferior de la tabla) y matriz de probabilidades (sector superior de la tabla) del análisis de Componentes Principales Análisis que relaciona las variables climáticas con el % de Germinabilidad del polen (GP). HR: humedad relativa; T°: temperatura; AT: amplitud térmica. * indica p significativo, ** indica un p altamente significativo.

	HR	HRmín	HRmáx	T°	T°mín	T°máx	AT	GP
HR	-	**	0,1874	**	0,2829	**	0,1633	0,1217
HRmín	0,906	-	0,2325	**	0,4469	0,0778	0,4004	0,2706
HRmáx	0,3473	0,3164	-	0,591	0,3195	0,9646	0,2375	0,0863
T°	-0,8618	-0,7321	-0,1454	-	0,0835	**	0,3399	0,0468
T°mín	-0,286	-0,2047	0,2659	0,4458	-	*	*	0,9601
T°máx	-0,6834	-0,4534	-0,0121	0,7529	0,5688	-	0,164	*
AT	-0,366	-0,2258	-0,3132	0,2553	-0,5578	0,3654	-	*
GP	0,403	0,2931	0,4422	-0,5035	-0,0136	-0,5671	-0,5569	-

La temperatura y la humedad relativa, así como las condiciones de almacenamiento, disminuyen el vigor del polen, pudiendo esto afectar la germinabilidad del polen de manera diferencial en distintas especies, ya que no todas muestran la misma sensibilidad a los distintos factores ambientales (Shivana et al., 1991). El efecto negativo de la temperatura observado en el análisis multivariado, también fue mencionado por otros autores. Barrow (1983) observó que el polen de algodón sometido a temperaturas entre 15 y 30°C mostró la misma viabilidad y germinabilidad que el polen fresco, con temperaturas de entre 33 a 40°C se vio afectado en su germinabilidad y por encima de 43°C el polen murió. Shivana et al. (1991) mencionan que en el polen de tabaco expuesto a 45°C la germinación *in vitro* falla por el extenso tiempo que toma la elongación del tubo polínico que, a veces, es mucho mayor al tiempo de incubación de este tipo de ensayo. Con respecto al girasol, en estudios realizados en Pakistán sobre viabilidad y germinabilidad de polen en dos temporadas del año (otoño y primavera), atribuyeron los valores más altos de germinación encontrados en otoño a la menor temperatura a la que fueron expuestos los granos en comparación con las condiciones climáticas imperantes en la primavera (Razzak et al., 2015).

Con respecto a la HR, si bien los análisis realizados en este estudio muestran una relación positiva que no llega a ser estadísticamente significativa, otros autores mencionan una disminución en la GP con porcentajes crecientes de la HR. Esto podría estar relacionado

a que estos autores exponen el polen a condiciones de alta humedad para evaluar el efecto de este parámetro en su almacenamiento. En cambio, los resultados expuestos en el gráfico multivariado (Figura 4.7) corresponden a la HR observada al momento de la toma de muestras, por lo cual el tiempo de exposición a la humedad ambiente registrada quizás no fue suficiente como para mostrar un efecto negativo. Además, el daño relacionado a este parámetro climático es muy dependiente de la especie de la que se trate y el porcentaje inicial de humedad del polen en cuestión (Nepi et al., 2001), siendo el girasol de las especies que menos humedad poseen, relacionado esto a su reserva energética de tipo lipídico. En este caso, incluso, la HR alta podría resultar un agente protector ante la desecación extrema producida por los fuertes vientos que caracterizan a esta región.

Teniendo en cuenta que los mismos factores que derivan en la polinización de tipo entomófila (protandria y presentación secundaria del polen) son los que exponen al polen a las condiciones climáticas fuera de la antera por un tiempo más prolongado, la continuidad de la GP observada en los distintos momentos del día estudiados resulta en una ventaja importante para que finalmente, cuando llegue a destino, mantenga su capacidad de fecundar al óvulo.

Sería fundamental conocer el tiempo de supervivencia final del polen para poder utilizarlo para el manejo de colmenas que se realiza en los servicios de polinización, ya que el estudio expuesto mostró que la pérdida de GP diaria resultó despreciable pero no se probó la cantidad de días en los que esta cae a valores poco riesgosos para la contaminación de colmenas trasladadas de un lote de producción de semilla a otro. En tal sentido, la influencia de los factores climáticos que fue analizada en este estudio, debe ser tomada en cuenta para la obtención de ese resultado.

4.4 ESTUDIOS DEL POLEN CORBICULAR

4.4.1 Origen botánico de las cargas colectadas

4.4.1.1 Materiales y métodos

Se realizó un inventario de las especies vegetales en flor observadas en las inmediaciones y/o dentro de los lotes de cultivo. Aquellas especies que no pudieron ser identificadas *in situ*, se colectaron y se determinaron en el Laboratorio de Sistemática Vegetal (Depto. de Agronomía, UNS).

Con el objeto de colectar cargas corbiculares, se colocaron trampas caza-polen de piquera (Figura 4.8 a y b) en dos colmenas localizadas en cada uno de los lotes estudiados (T, CL y AO; Tabla 2.1). Las mismas permanecieron durante tres días.

En cada sitio se juntaron las cargas recogidas en ambas colmenas (Figura 4.8 c), se secaron durante dos días en estufa a 40 °C y fueron conservadas en freezer para su posterior análisis.

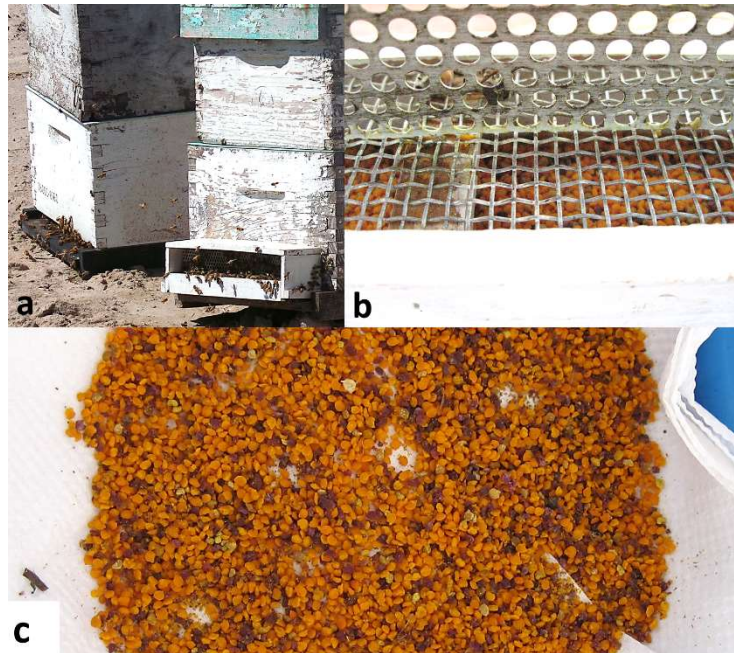


Figura 4.8: Colección de cargas corbiculares. a: Trampa caza-polen colocada en la piquera de la colmena. b: Interior de la trampa caza polen. c: Cargas corbiculares colectadas.

En el laboratorio, se procesaron 3 repeticiones de 4 g cada una (Armaza, 2013) de las cargas corbiculares recogidas en cada campaña, las que fueron separadas por color, tamaño y textura (Louveaux y et al., 1978; Figura 4.9).

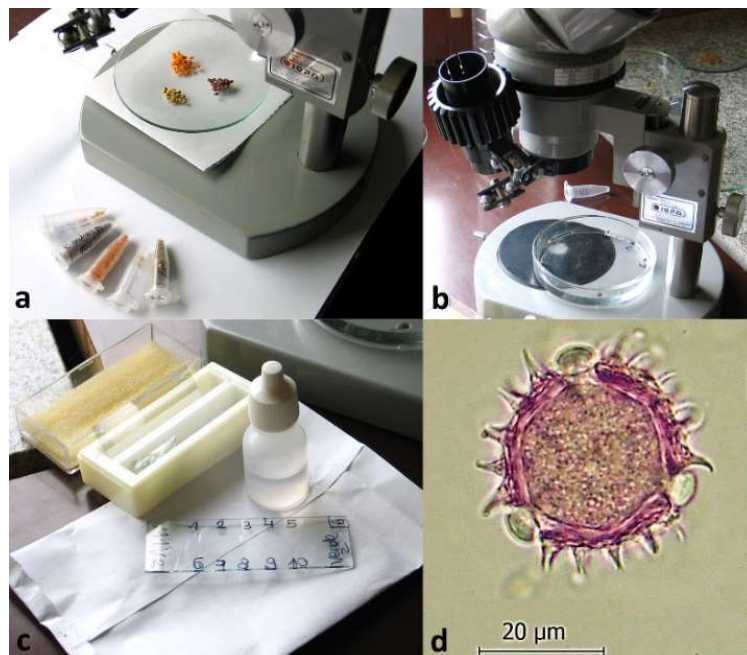


Figura 4.9 a y b: Separación por color de las cargas corbiculares bajo lupa. c: Elaboración de los preparados para determinación de origen botánico. d: Observación en microscopio óptico de granos de polen de *Helianthus annuus* procesados con el método de Wodehouse (1935).

Para la determinación de su origen botánico, cargas ya separadas fueron procesadas según los métodos de Erdtman (1960) y Wodehouse (1935) y observadas al microscopio óptico (Figura 4.9 d). La identificación botánica se realizó utilizando la Palinoteca de Referencia del LabEA-UNS. Una vez identificadas, fueron contabilizadas para calcular la Frecuencia de aparición (%) de cada tipo polínico en cada muestra.

4.4.1.2 Resultados y discusión

La Tabla 4.2 presenta las especies en floración censadas en los lotes de producción de semilla híbrida de girasol donde se realizaron los muestreos.

Tabla 4.2: Especies en flor censadas en los tres sitios de muestreo T, CL y AO.

Familia	Nombre científico	Lote		
		T	CL	AO
Apiaceae	<i>Ammi visnaga</i> L.	X	X	X
Asteraceae	<i>Carduus pycnocephalus</i> L.	X	X	
	<i>Centaurea calcitrapa</i> L.			X
	<i>Centaurea solstitialis</i> L.			X
	<i>Conyza bonariensis</i> L.	X	X	
	<i>Onopordum acanthium</i> L.			X
	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	X	X	X
	<i>Tessaria absinthioides</i> (Hook. & Arn.) DC			X
	<i>Xanthium spinosum</i> L.	X	X	X
Brassicaceae	<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.			X
	<i>Hirschfeldia incana</i> (L.) Lagr.-Fossat	X	X	
	<i>Raphanus sativus</i> L.			X
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium album</i> L.			X
	<i>Dysphania pumilio</i> (R. Br) M. & C.		X	
	<i>Salsola kali</i> L.			X
Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i> L.			X
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia serpens</i> Kunth.	X	X	
Fabaceae	<i>Glycine max</i> L.		X	
	<i>Medicago sativa</i> L.			X
	<i>Melilotus albus</i> Desr.			X
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> sp.	X	X	X
Poaceae	<i>Zea mays</i> L.		X	
Polygonaceae	<i>Polygonum aviculare</i> L.	X	X	X
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.	X	X	X
Solanaceae	<i>Salpichroa organifolia</i> (Lam.) Baill.		X	
	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.			X
	<i>Solanum triflorum</i> Nutt.		X	
Zygophyllaceae	<i>Tribulus terrestris</i> L.			X

El estudio de las cargas corbiculares permitió identificar los tipos polínicos colectados por las abejas, junto al girasol. En el lote T (Figura 4.10 a) se encontraron 8 tipos polínicos siendo de girasol el 75,81 % \pm 2.74 % del total; en el lote CL fueron 7 los tipos polínicos

hallados y las cargas de girasol correspondieron al $41,88 \% \pm 1,08 \%$ de la muestra (Figura 4.10 b) mientras que en el lote AO se encontraron 12 tipos polínicos y el girasol apareció en el $3,86 \% \pm 0,01 \%$ de las cargas colectadas (Figura 4.10 c). Algunos de los tipos polínicos más frecuentes en las cargas se ilustran en la Figura 4.11.

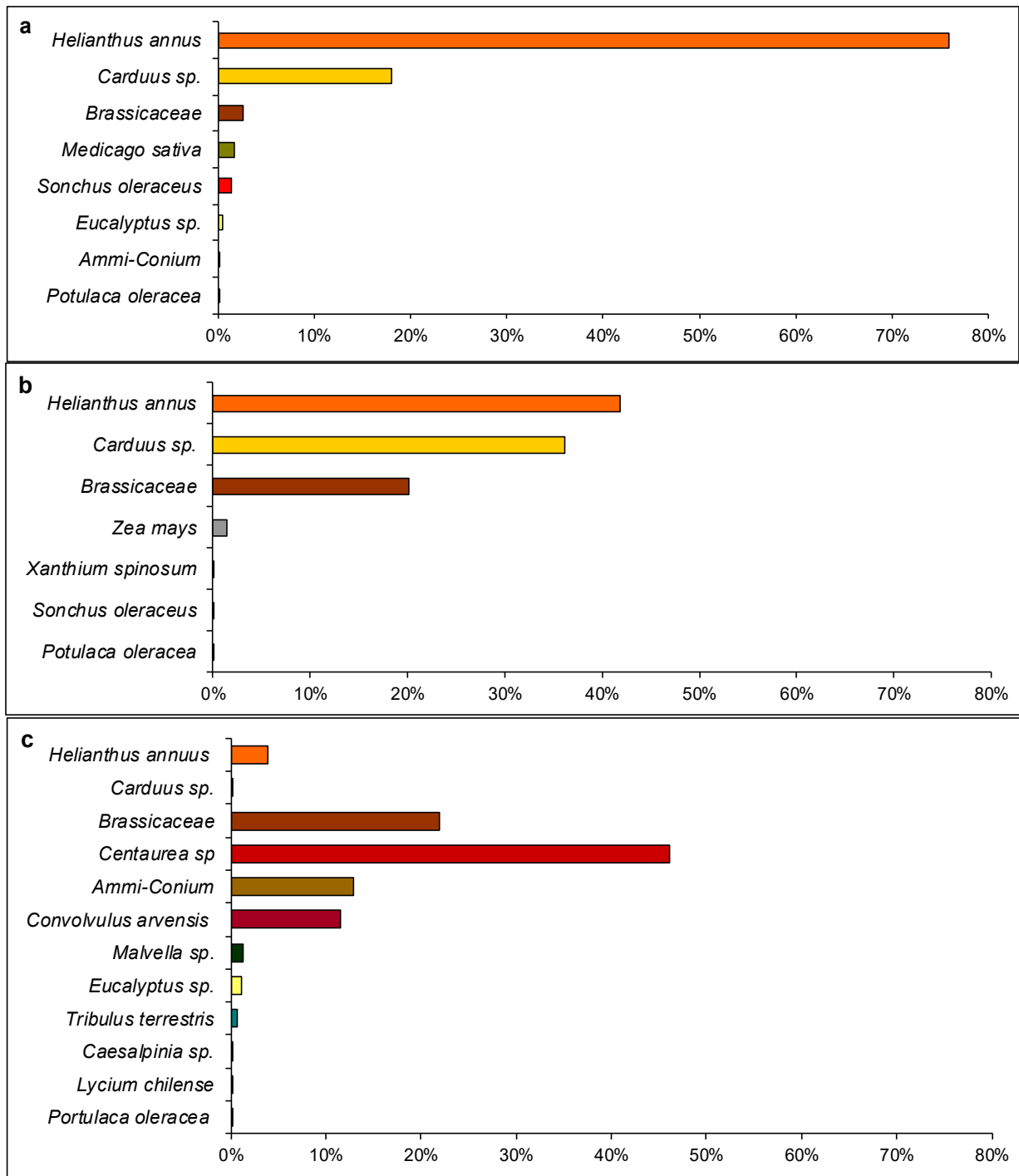


Figura 4.10 a: Tipos polínicos y su frecuencia de aparición (%) en las cargas recolectadas en el lote T, b: en el lote CL y c: y en el lote AO.

El sitio con mayor cantidad de malezas presentes (Figura 4.12), donde se obtuvo el porcentaje más bajo de cargas corbiculares de girasol y la aparición de tipos polínicos no

registrados en el censo de vegetación (Tabla 4.2), demuestran que la abeja destina energía para explorar y pecorear otras áreas en función de la selectividad de las fuentes alimenticias que utiliza. Incluso, cuando el cultivo está en plena floración y es muy abundante, un buen flujo de néctar o polen de otras especies puede atraer a las abejas lejos de él (Crane, 1990).

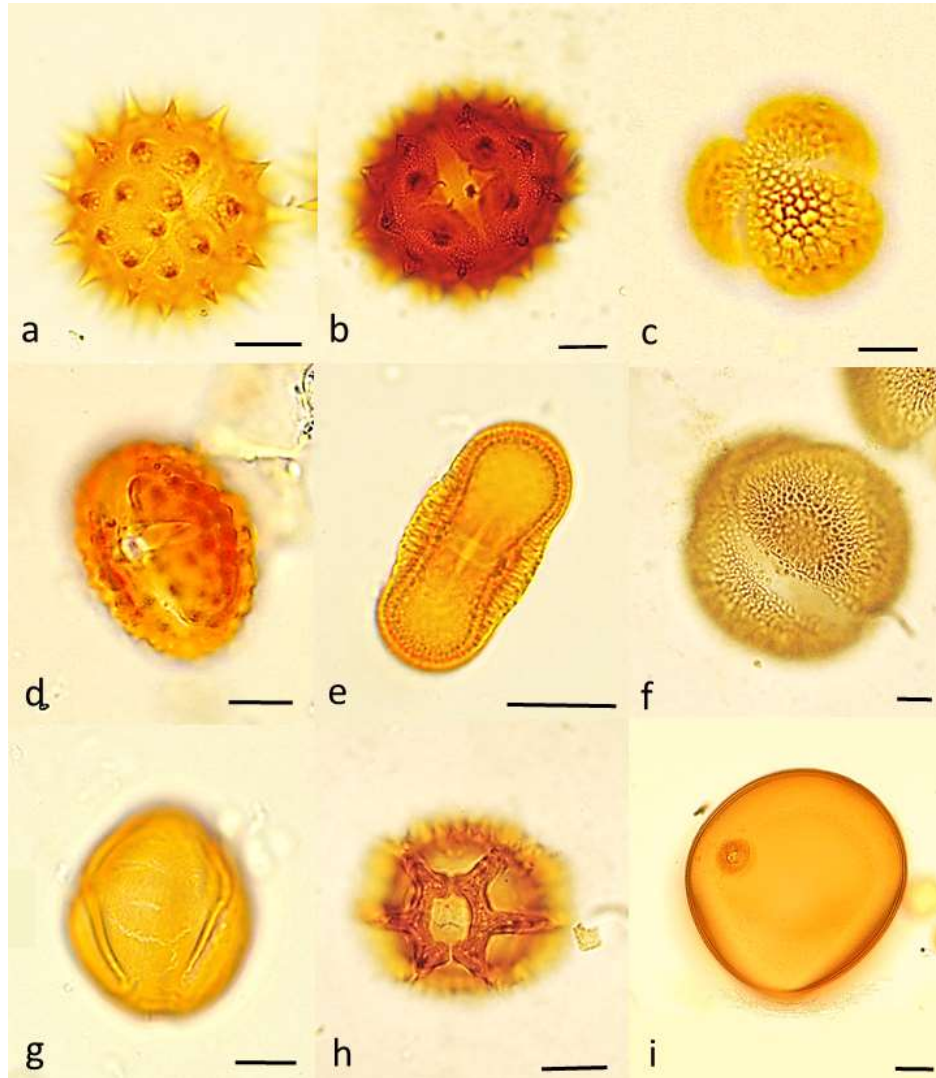


Figura 4.11: Tipos polínicos de mayor % de frecuencia de aparición. a) *Helianthus annuus*. b) *Carduus* sp. c) Brassicaceae, d) *Centaurea* sp., e) *Ammi-Conium*, f) *Convolvulus arvensis*, g) *Medicago sativa*, h) *Sonchus oleraceus*, i) *Zea mays*. Barra: 10 μ m.

Para estos insectos, la diversidad en la dieta es necesaria para evitar deficiencias nutricionales como, por ejemplo, en aminoácidos esenciales (Nicolson y Human, 2013). Además, es útil para diluir toxinas y mantener en condiciones el sistema inmunológico (Alaux et al., 2010). Esto es especialmente importante cuando las colmenas permanecen en monocultivos, como en este caso el girasol, que presenta polen de baja calidad (Nicolson y Human, 2013) y es una razón convincente para permitir que las malezas y la vegetación natural persistan en sistemas agrícolas a gran escala (Schmidt et al., 1995; Carvalheiro et al. 2011). Un nivel nutricional adecuado de la colonia asegura un correcto desarrollo de la misma

e influye sobre el pecoreo y movimiento de las abejas por el lote de producción. Es decir, es necesario un equilibrio para que estos polinizadores no destinen demasiado tiempo pecoreando flora ajena al lote de producción, pero con un desarrollo de la colmena adecuado para que realicen sus tareas con normalidad.



Figura 4.12: Vista del lote contiguo al AO donde se observa una abundante presencia de especies espontáneas en floración.

Si bien los sistemas de producción de semilla requieren de un control exhaustivo del tipo de vegetación que puede permanecer en cercanías el lote, el conocimiento de las especies visitadas permite evaluar su manejo y replantear el concepto de flora competitiva por el de flora acompañante.

4.4.2 Caracterización de las cargas de Girasol

4.4.2.1 Materiales y métodos

Se realizó una caracterización morfológica de las cargas polínicas de girasol obtenidas en los distintos lotes de producción, denominando CM a las cargas recolectadas en el lote T; CMCL a las recolectadas en el lote CL y CMAO a las colectadas en el lote AO. En 14 cargas tomadas al azar de cada genotipo se registró el peso seco, ancho, largo y alto. Con los tres últimos parámetros medidos se calculó el volumen de las cargas, asumiendo una forma elipsoidal de las mismas, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \frac{4 * \pi * \text{An} * \text{L} * \text{Al}}{3}$$

An: Ancho (mm)
L: Largo (mm)
Al: Alto (mm)

Finalmente, en 10 de las cargas, se determinó el número de granos de polen promedio, calculándose luego el peso del grano de polen. Los datos fueron analizados con un ANOVA simple y la comparación se realizó con el test LSD de Fisher.

4.4.2.2 Resultados y discusión

Las CMCL presentaron mayor número de granos de polen ($F_{2,27} = 4,56$; $p = 0,0196$) que las de los otros genotipos masculinos (Figura 4.13 a). También presentaron mayor peso seco que las de CMAO (Figura 4.13 b), no encontrándose diferencias en este parámetro con las de CM ($F_{2,39} = 6,09$; $p = 0,005$). El peso del grano de polen no mostró diferencias significativas entre los materiales estudiados ($F_{2,27} = 0,06$; $p = 0,9392$; Figura 4.13 c).

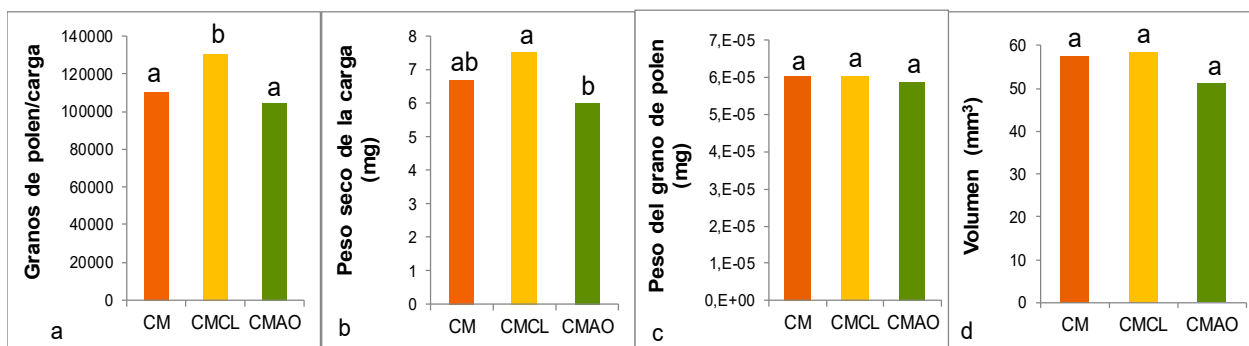


Figura 4.13: Granos de polen flor (a), peso seco de las cargas (b) y peso del grano de polen (c) para las cargas de los materiales en estudio: CM, CMCL y CMAO. Letras distintas expresan diferencias significativas.

Con respecto a las dimensiones de las cargas, el volumen no arrojó diferencias significativas entre los materiales ($F_{2,27} = 4,56$; $p = 0,0196$); Figura 4.13 d).

Armaza et al. (2013) registraron valores inferiores respecto al volumen, peso seco y número de granos de polen en las cargas corbiculares ($34,7 \pm 3,9 \text{ mm}^3$; $4,64 \pm 0,5 \text{ mg}$ y $47.583,3 \pm 12.918,6$; respectivamente) lo cual podría estar relacionado a la genética de las abejas utilizadas para polinizar cada sistema de producción (Milne et al., 1986), ya que, al momento del armado de la carga, la misma toma la forma de la corbícula.

El polen de girasol posee pollenkitt que, junto con la forma equinada de los granos, determinan la adherencia del mismo (Lin et al., 2013), factor de gran importancia en la polinización entomófila donde este gametofito debe ser transportado en el cuerpo de los insectos. Además, las características mencionadas influyen la eficiencia de armado de la carga corbicular (Figura 4.14) determinando la cantidad de granos de polen que puede contener y la compactación de la misma. En tal sentido, Vaissière y Vinson (1994) en un estudio sobre pecoreo de abeja melífera en el cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), concluyeron que la longitud de las espinas de su polen era la principal causa de la baja eficiencia de cosecha respecto de otras especies con distinta ornamentación.

Investigaciones recientes (Lunau et al., 2015) sugieren que tanto las espinas como el pollenkitt son mecanismos de defensa en respuesta al dilema que ocurre en las plantas polinizadas por abejas donde el polen que ha sido recogido en la carga ya no estará disponible para realizar la función reproductiva.

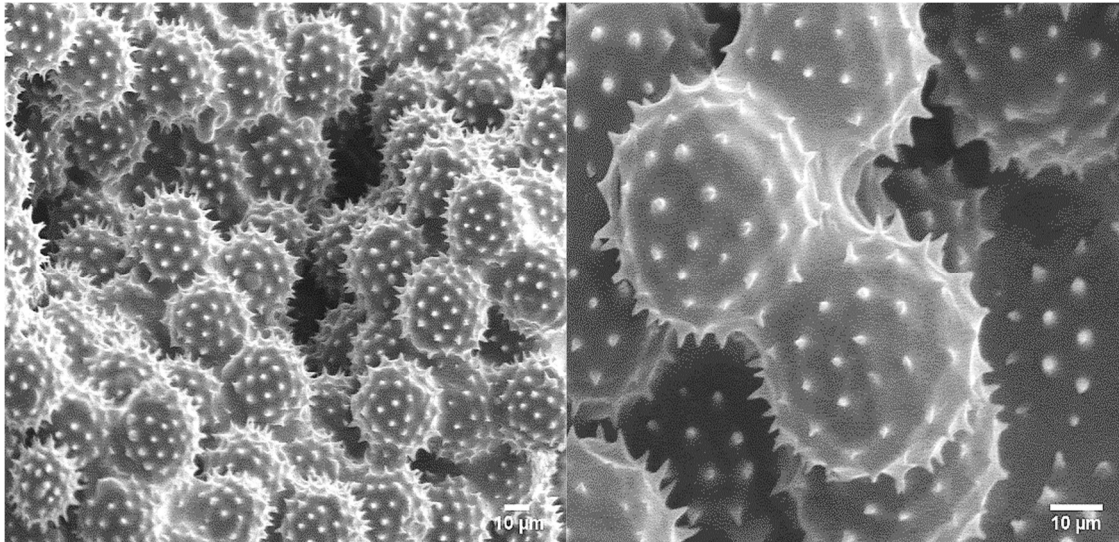


Figura 4.14: Fotomicrografías MEB del interior de una carga corbicular de girasol (*Helianthus annuus* L.). Se observan los granos de polen equinados aglutinados por una matriz de pollenkitt, néctar y secreciones salivares de la abeja.

4.4.3 Contenido nutricional de las cargas colectadas

4.4.3.1 Materiales y métodos

Las cargas corbiculares de los tipos polínicos más frecuentes fueron analizados con un equipo Goldfish (Figura 4.15) para determinar el contenido de lípidos mientras que el contenido de Nitrógeno total se realizó con la técnica de micro Kjeldahl en el LABSPA (CERZOS–CONICET). De acuerdo a Rabie (1983), los valores obtenidos fueron multiplicados por un coeficiente (factor de corrección) de 5,6 para estimar la proteína bruta del polen.



Figura 4.15: Equipo Goldfish utilizado para la extracción de lípidos totales.

4.4.3.2 Resultados y discusión

En la Figura 4.16 se observan las cargas corbiculares de los cuatro tipos más frecuentes.

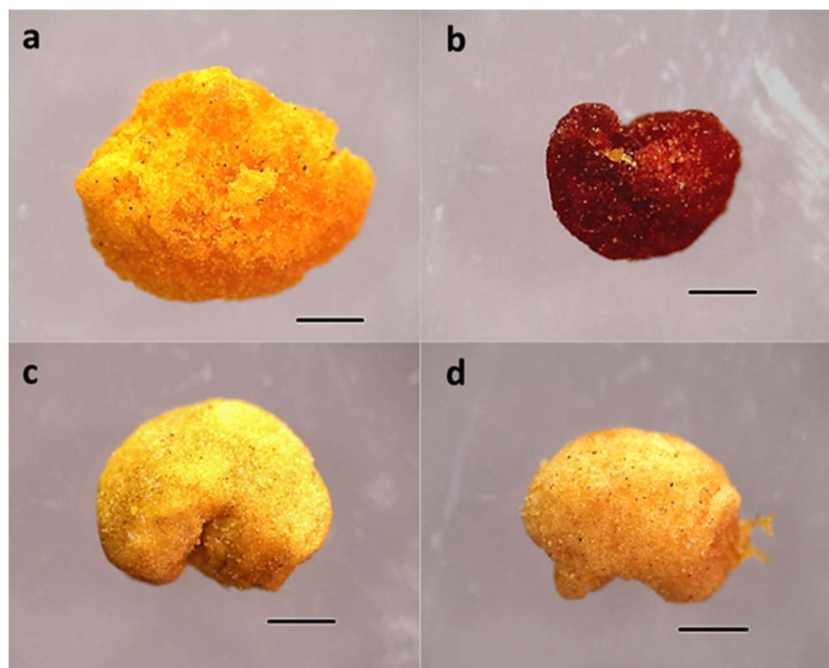


Figura 4.16: Cargas corbiculares más frecuentes. a: *Helianthus annuus* L. b: Tipo *Carduus* sp. c: Tipo Brassicaceae. d: *Centaurea* sp. Barra= 1mm.

En la Tabla 4.3 se presentan los contenidos de aceite y proteína bruta de las cargas corbiculares correspondientes a los tipos polínicos más cosechados. Como se observa, el girasol es en general el tipo polínico más deficiente en ambos nutrientes.

Tabla 4.3: Contenido nutricional de las cargas corbiculares de los tipos polínicos más frecuentes colectadas en los distintos sitios de muestreo. * Factor de corrección: 5,6 (Rabie, 1983). **no pudo ser calculado ya que no se contaba con la cantidad de muestra necesaria.

Sitios de muestreo	Tipo polínico	% Aceite	% Proteína bruta*
Lote T	<i>Helianthus annuus</i>	2,427	13,591
	<i>Carduus</i> sp.	8,001	20,541
	Brassicaceae	**	24,909
Lote CL	<i>Helianthus annuus</i>	2,609	14,093
	<i>Carduus</i> sp.	6,667	20,608
	Brassicaceae	6,903	26,045
Lote AO	<i>Helianthus annuus</i>	2,675	19,129
	<i>Centaurea</i> sp.	4,848	27,356
	Brassicaceae	7,150	28,302

Los valores nutricionales obtenidos fueron coincidentes con los reportados en otros estudios (Somerville y Nicol, 2006; Tasei y Aupinel, 2008). Nicholson y Human (2013) documentaron para girasol valores del 14,2 % de proteína y del 5,5 % de lípidos, este último un poco superior al observado en este estudio. Con respecto a los lípidos se conoce que el girasol tiene un nivel relativamente bajo nivel de ácidos linoleico y linolénico pero muy alto

nivel de ácido mirístico, el que podría ser perjudicial para las abejas si fuera su única fuente de lípidos (Manning, 2001).

Los bajos niveles nutricionales del polen de girasol con respecto a los otros tipos evaluados (Tabla 4.3) explicarían la baja preferencia de las abejas por el polen de este cultivo. De todas maneras, los porcentajes de cargas de girasol en los lotes T y CL fueron altos con respecto a otros estudios en la Argentina (Andrada et al. ,2004) lo cual es atribuible al gran control de malezas que presentaban estos lotes.

4.5 CONCLUSIONES

- Se encontró una producción polínica diferencial en los genotipos comparados (M y MCL), siendo superior en el material Clearfield y en el SI del capítulo
- No se encontró un patrón común en la producción de GPF intracapítulo (SI, SM y SE) en los tres machos estudiados
- La estabilidad respecto a la producción polínica del MCL en distintos años y sitios de muestreo permite inferir una fuerte influencia del factor genético por sobre el ambiental
- Si bien la germinabilidad del polen mostró en el análisis multivariado tener cierta vulnerabilidad con las características climáticas (principalmente las asociadas a la temperatura), la misma se mantiene estable a lo largo del día.
- El manejo agronómico de los sistemas muestreados determinó que el girasol sea el principal tipo polínico encontrado en las cargas corbiculares en los lotes T y CL, a pesar de su escaso valor nutricional (demostrado a través de los contenidos de PB y lípidos presentados). En cambio, la presencia de flora acompañante en el lote AO interfirió fuertemente en el pecoreo de *Apis mellifera*
- La abeja realiza un pecoreo selectivo de las especies que se encuentran en floración, lo que se manifestó en el muestreo de las cargas corbiculares con la aparición de tipos polínicos de especies que no fueron observadas en el censo de vegetación
- Las cargas corbiculares de los tres materiales androfértiles estudiados no mostraron diferencias en su forma (lo cual es esperable dado que el polen se amolda a la corbícula de la abeja) pero si en la cantidad de granos de polen que contenían y, por ende, en su peso seco, siendo estos parámetros superiores en el material Clearfield.

CAPÍTULO 5: ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LAS FLORES

5.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas emplean diversas señales con la finalidad de atraer a los polinizadores que, en su mayoría, son insectos. Los estímulos o señales visuales, olfativos y táctiles que poseen las flores pueden actuar separadamente, pero, en conjunto, determinan la atracción del visitante y su comportamiento, de acuerdo con su percepción sensorial, habilidad para aprender y experiencia (Dafni, 1992). La base cognitiva de la atracción de los polinizadores hacia estas señales depende de las respuestas de comportamiento innatas, las de aprendizaje y la interacción entre ambas. Así, la percepción de los polinizadores y su comportamiento asociado constituyen un ambiente selectivo clave para las características florales ya que la relación entre estas señales y su recepción, determinan el éxito reproductivo (Schiestl y Johnson, 2013).

Los programas de mejoramiento, generalmente enfocados en incrementar el rendimiento de los cultivos, seleccionan en base a caracteres que están directamente relacionados con ese fin sin advertir que muchas características florales, de manera indirecta, también pueden incidir positivamente en la producción. Por este desconocimiento de los atributos florales en los procesos de selección artificial, sería lógico esperar una gran variabilidad de los mismos entre distintos genotipos dentro de un mismo cultivo (Cerrutti y Pontet, 2016) y conocerlos, una herramienta útil de manejo en aquellas especies que requieren de la polinización entomófila.

Dentro de la gran variedad de insectos que actúan como polinizadores, existen distintas preferencias y percepciones a estas señales, lo que está relacionado a sus características individuales y poblacionales (Tepedino y Parker, 1982; DeGrandi-Hoffman y Watkins, 2000; Mallinger y Prasifka, 2017).

Muchos experimentos han demostrado que las abejas son capaces de distinguir entre flores que poseen recompensas de las que no cuando emiten diferentes aromas o colores (Pernal y Currie, 2002; Chittka y Raine, 2006; Muth et al., 2016).

La efectividad de las señales florales dependerá de cuan fuertemente correlacionadas estén con las reales recompensas alimenticias. La señal más eficiente para el polinizador sería aquella cuya magnitud y variabilidad está relacionada de manera directa a las de la recompensa, es decir, una señal de mayor intensidad a mayor recompensa ofrecida. En este sentido, es más fácil encontrar este fenómeno en las señales aromáticas que en las morfológicas que naturalmente tienen menor variabilidad (Knauer y Schielt 2015).

Si bien se conoce que el néctar y el polen como fuente alimenticia pueden modificar el comportamiento de los polinizadores, entender qué características morfológicas de las

plantas participan en esta interacción, no es tarea sencilla. En general, las características de la recompensa ofrecida y aquellas asociadas a señalar su existencia operan en conjunto, dificultando individualizar el efecto que tiene en la atraktividad cada una de ellas (Raguso, 2004).

En el caso del girasol, el tipo de inflorescencia plantea un escenario complejo a la hora de estudiar el efecto que presentarían en la atraktividad las distintas estructuras que la componen. El capítulo funciona como una unidad funcional donde las flores exteriores tienen una función netamente visual mientras que las del disco, eventualmente, contienen las recompensas primarias, es decir, el néctar y el polen.

En general, si bien el área floral se considera el predictor más fuerte y consistente de la abundancia de abejas y la riqueza de especies, operando desde la escala individual de la planta hasta el paisaje (Conner y Rush 1996; Potts et al., 2003; Blaauw e Isaacs, 2014), no es la única variable que puede interferir en la relación planta-polinizador.

Varios autores demostraron el efecto de las flores liguladas en la atraktividad de especies dentro de la familia Asteráceas (Stuessy et al., 1986; Anderson 1991; Anderson 1996; Celedón-Neghme 2007; Nielsen et al. 2002; Cerca et al., 2019). Sin embargo, poco se conoce del mismo sobre el girasol (Cerrutti y Pontet, 2016), menos aún en líneas parentales, donde la gran diversidad de materiales utilizados y el hecho de que no se seleccione en los programas de mejoramiento sobre este tipo de característica, amplía el rango de variabilidad asociada a este componente de la inflorescencia. Se conoce que, en esta especie, las flores liguladas absorben luz en el rango ultravioleta y reflejan en patrones diferentes entre genotipos, lo que podría inferirles una atraktividad diferencial (Schneiter, 1997). Sammataro et al. (1986) realizaron un trabajo de descripción de las flores liguladas muy detallado. Expusieron la existencia de patrones de absorción y reflexión de la luz UV distintos en la región interna y externa de la lígula que se deberían a una diferencia en la morfología de las papilas desarrolladas en este tipo de corola (la zona de absorción UV estaría en el área de papilas cónicas y estriadas mientras que en la zona de reflexión UV las papilas serían globulares). En un trabajo mucho más actual en girasol silvestre, Wojtaszek y Maier (2014) amplían este concepto describiendo que la parte distal de la lígula, más clara, serviría para señalarle, a largas distancias, a las abejas una pista de aterrizaje, mientras que la zona basal, más oscura, actuaría como guía de néctar. Además, complementan la descripción de las papilas que comienza Sammataro exponiendo que las de forma cónica tendrían los pigmentos que absorben la luz UV en el citoplasma y vacuola de estas células epidérmicas.

En cuanto a las flores tubulosas, varios aspectos de su morfología pueden influir en la polinización, tanto los relacionados a la corola como a las ramas estigmáticas o al nectario que se encuentra en la base del estilo.

Existen trabajos realizados en diversas especies que plantean una correlación positiva entre el largo de la corola y el volumen secretado de néctar (Davis, 2001; Galetto y Bernardello, 2004). En el girasol, se ha documentado que la longitud de las flores del disco puede influir tanto en la secreción como en la obtención del néctar por parte de las abejas (Cerrutti y Pontet, 2016). En cuanto a la atractividad, algunos trabajos demostraron que tanto las abejas melíferas como las silvestres prefieren corolas más cortas (Shein et al., 1980; Sammataro et al., 1983; Mallinger y Prazifka, 2017; Portlas, 2018). Otros, si bien apoyan esta hipótesis, no pudieron demostrarlo con correlaciones estadísticamente significativas (Bailes y Bedascarrasbure, 1987; Whitted, 2019). Esto podría estar relacionado, principalmente en el caso de la abeja melífera, a que mientras las corolas tengan un largo que permita al insecto libar el néctar, éste no rechaza el recurso disponible (Whitted, 2019). En tal sentido, se menciona un largo promedio de probóscide de entre 6 y 7 mm (Waddington y Herbst, 1987; Ion et al., 2007).

La variabilidad de este parámetro entre las numerosas líneas parentales de girasol utilizadas para la producción de semilla híbrida (Miklič et al., 2004; Cerrutti y Pontet, 2016; Whitted, 2019), la estabilidad del mismo entre años (Joksimović, 2003; Portlas, 2018) y su heredabilidad (Atlgic, 2003), permiten considerar que sería factible introducirlo en los programas de mejoramiento de las líneas parentales.

Por otra parte, las características de los nectarios están íntimamente relacionadas a la atractividad de los polinizadores a través de su principal función: la secreción de néctar. Tal es así, que se considera que las plantas que requieren polinización entomófila y puntualmente sus nectarios, fueron evolucionando en conjunto con sus polinizadores (Parachnowitsch et al., 2019).

Estos órganos florales han sido clasificados por distintas características que comprenden desde su estructura (Fahn, 1979), el tipo de tejido que los compone (Vogel, 1977), su ubicación (Schmid, 1988) y su persistencia en la planta (Smets, 1986; Smets y Cresens, 1988), entre otras. Nepi (2007), resumiendo los estudios que lo antecedieron, encontró que, en el caso de tener una estructura organizada, la misma está conformada principalmente por tres estratos, que incluyen la epidermis y dos capas de tejido parenquimático, que difieren en la morfología de sus células y vascularización. La epidermis interviene en la secreción liberando el néctar de diferentes maneras según la naturaleza del nectario. La secreción de néctar a través de los estomas parece ser la forma más común, sobre todo dentro de la Clase Dicotiledóneas (Bernardello, 2007).

En el girasol, la morfología general del nectario se corresponde con la de esta estructura en la familia Asteráceas. Se trata de un nectario floral de tamaño pequeño y de forma anular que se encuentra en el ápice del ovario, rodeando la base del estilo (Brown, 1938; Frei, 1955; Cronquist, 1981; Mani y Saravanan, 1999). Hay variabilidad dentro de un

mismo capítulo, siendo las flores hermafroditas del disco generalmente nectaríferas, mientras que las liguladas carecen de nectarios o los mismos son más pequeños. El número de estomas, principal vía de secreción en esta familia, puede variar entre especies (Mani y Saravanan, 1999). El tipo de vascularización del nectario también resulta variable (Frei, 1955; Gulyás y Pesti, 1966) siendo citada para el caso del girasol, principalmente la vascularización floemática (Sammataro et al., 1985).

Existen estudios que presentan una relación positiva entre el tamaño de los nectarios y la secreción en diversas especies, entre ellas, el girasol (Sammataro et al., 1983; Galetto y Bernardello, 2004; Castro et al., 2009). Las diferencias entre genotipos en cuanto al tamaño de los nectarios (Sammataro, 1985), plantea un interesante campo de acción a ser tenido en cuenta para la selección de los parentales productores de semilla.

Para los numerosos cultivos dependientes de polinización en todo el mundo, favorecer los rasgos florales que incentivan la atracción de polinizadores podría contribuir no sólo a obtener mayores rendimientos de las cosechas sino a mejorar los recursos alimenticios para los polinizadores (Mallinger et al., 2017). En el caso de la producción de semilla híbrida de girasol, es de suma importancia tener en cuenta todos estos factores atractivos, no solo para el manejo de los lotes de producción sino para el mejoramiento de las líneas parentales.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la morfología de las flores liguladas de los capítulos en cada genotipo
- Estudiar la morfología de las flores tubulosas y su variabilidad durante la floración de los capítulos
- Estudiar la morfología y superficie de los nectarios
- Evaluar la estabilidad genética de los parámetros morfológicos estudiados
- Evaluar la cercanía de los genotipos en función de los parámetros estudiados

5.3 CARACTERÍSTICAS DEL CAPÍTULO Y FLORES LIGULADAS

5.3.1 Materiales y métodos

Los estudios que se presentan a continuación fueron realizados sobre capítulos colectados en todos los materiales muestreados en 2014 y 2015 (Tabla 2.1).

Se cortaron 5 capítulos de cada genotipo en los EF R5.2, R5.5 y R5.8 (Figura 4.1) a los que se les registró:

- *Diámetro del receptáculo (DR)*
- *Número de flores liguladas (NFL)*

Cinco de estas flores extraídas al azar fueron escaneadas (Figura 5.1 a), y las imágenes resultantes fueron analizadas en gabinete utilizando el software ImageTool, con el fin de obtener el área de la corola (“Área liguladas”).

En las H2, dada la morfología plegada sobre sí misma que presentaron las lígulas, se procedió a escanearlas de dos maneras: 1) tal y como se extrajeron del capítulo y 2) extendiendo la corola, es decir, simulando el área que tendrían si sus bordes se encontraran ubicados sobre un único plano. Esto dio lugar, respectivamente, a las variables:

1. *Área real* (equivalente a *Área liguladas*)
2. *Área potencial*

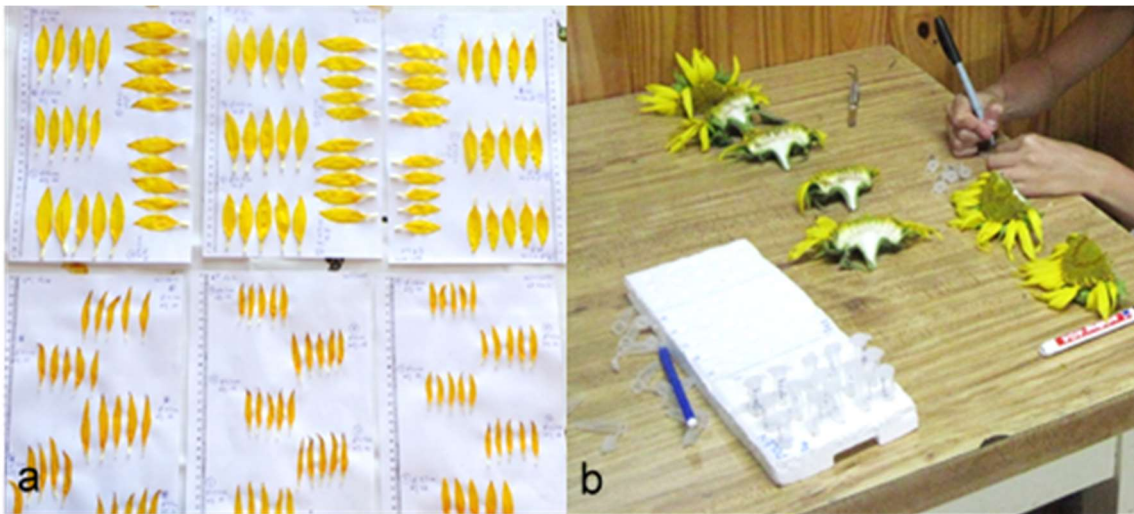


Figura 5.1 a: Flores liguladas acondicionadas para ser escaneadas. b: Rotulado de tubos eppendorf en los que se fijaron las flores tubulosas en solución FAA.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2008) a través de un ANOVA doble, genotipo*estadio fenológico, comparando los materiales que compartían el mismo lote de producción y momento de colección de los capítulos, es decir, dentro de los materiales T, CL y AO correspondientes a cada muestreo. Las comparaciones entre medias se realizaron con el test LSD de Fisher con un nivel de significación del 0,05. Los datos correspondientes a cada flor fueron promediados ya que se demostró que aportaban un componente aditivo de varianza.

Finalmente, a través del análisis multivariado se exploró la relación entre los distintos materiales genéticos en función de la integración de las variables morfométricas medidas utilizando componentes principales y análisis de conglomerados ((Di Rienzo et al., 2008).

5.3.2 Resultados y discusión

5.3.2.1 Diámetro del receptáculo

El ANOVA doble realizado para este parámetro en los materiales T y CL, mostró una interacción significativa ($F_{4,36} = 4,52$, $p = 0,0046$) razón por la cual se observan por separado

los gráficos correspondientes a la comparación entre genotipos (Figura 5.2) y entre estadios (Figura 5.3).

Analizando este parámetro entre los distintos genotipos (Figura 5.2) se puede observar que, en general, las hembras H1 y H2 tanto en materiales T como CL, no presentaron diferencias significativas entre sí, pero si se diferenciaron de los materiales androfértiles (M: $F_{2,36} = 77,23$; $p < 0,0001$ y MCL: $F_{2,36} = 44,19$; $p < 0,0001$).

En los genotipos AO la comparación entre parentales presentó la misma tendencia en los tres EF (Interacción: $F_{1,24} = 0,18$; $p = 0,8405$), siendo significativamente mayor el DR en los capítulos androestériles, hecho que se repite en todos los materiales estudiados.

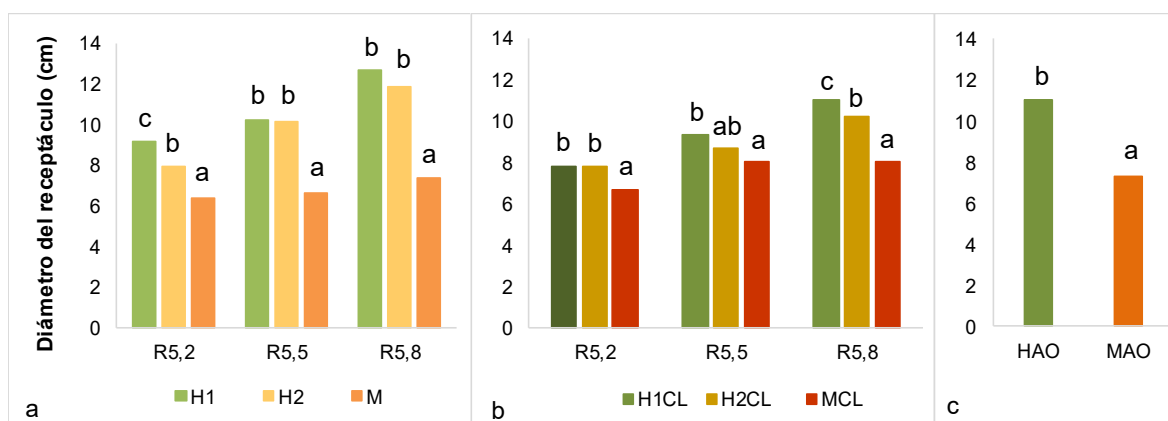


Figura 5.2: Diámetro promedio del receptáculo (cm) de los materiales genéticos: a, Tradicionales, b, Clearfield y c, Alto oleico, en los estadios fenológicos R5.2, R5.5 y R5.8. En a y b se grafica la comparación entre genotipos separada por estadio fenológico debido a la presencia de interacción genotipo*estadio fenológico. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos con un $p < 0.05$.

En cuanto a la comparación entre estadios (Figuras 5.3) se puede observar el aumento del DR a medida que avanza su desarrollo, crecimiento que se mantiene hasta la antesis de las flores centrales. Este crecimiento no se manifiesta en los machos, los cuales, como se mencionó anteriormente, presentan menor diámetro de capítulo en todos los sistemas estudiados.

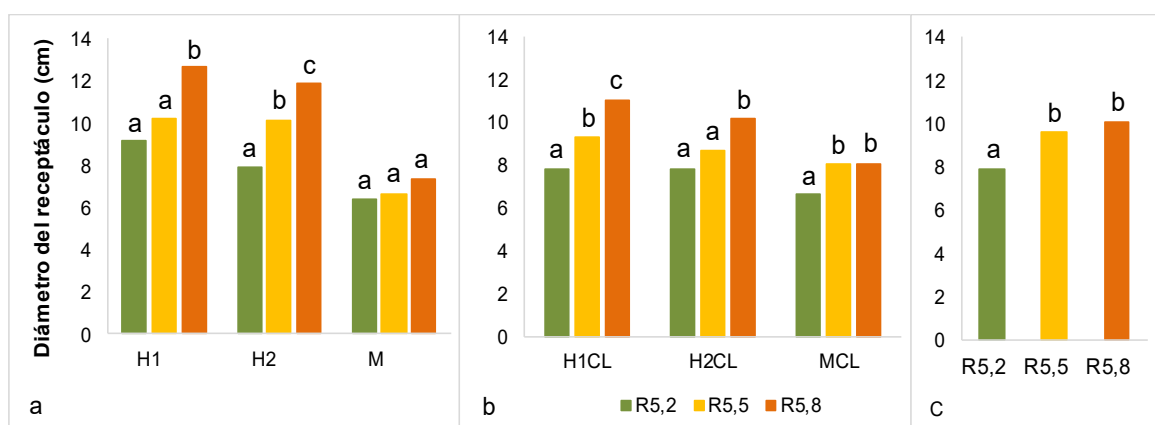


Figura 5.3: Diámetro promedio del receptáculo (cm) en los EF R5.2, R5.5 y R5.8, para los genotipos: a, Tradicionales, b, Clearfield y c, Alto oleico. En a y b se grafica la comparación entre estadios fenológicos separada por genotipos debido a la presencia de interacción genotipo*estadio fenológico. Letras distintas indican diferencias significativas con un $p < 0.05$.

5.3.2.2 Características de las flores liguladas

En las Figuras 5.4, 5.5 y 5.6 se observan imágenes tomadas a los capítulos de los materiales estudiados en los lotes de producción y las flores liguladas escaneadas para el cálculo del área.

Las hembras H2 y H2CL presentaron una morfología particular de las flores liguladas: los pétalos marginales eran más largos que los centrales, de manera que los bordes de cada corola quedaban ondulados. Estas flores daban un aspecto a los capítulos, comparable al estadio R6 (Schneiter y Miller, 1981), cuando las flores del radio comienzan a senecer luego de completar la antesis de todas las flores del disco.

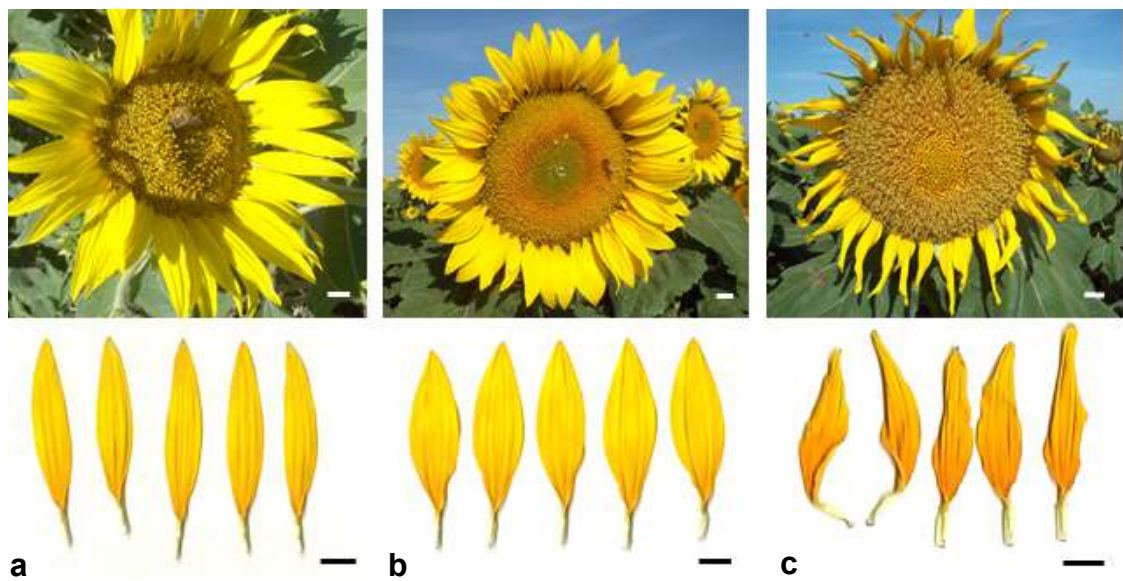


Figura 5.4: Capítulos y flores liguladas de los genotipos en el lote T; (a) línea androfertil M; (b) y (c) líneas androestériles H1 y H2, respectivamente. Barra: 1cm.

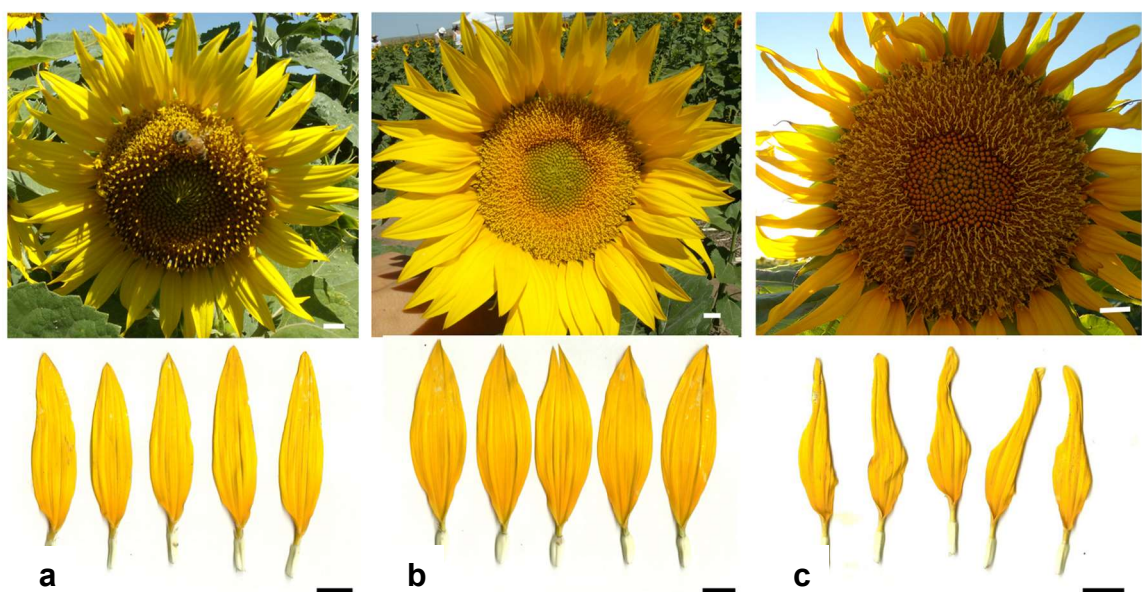


Figura 5.5: Capítulos y flores liguladas de los genotipos en el lote CL; (a) línea androfertil MCL; (b) y (c) líneas androestériles H1CL y H2CL, respectivamente. Barra: 1cm.

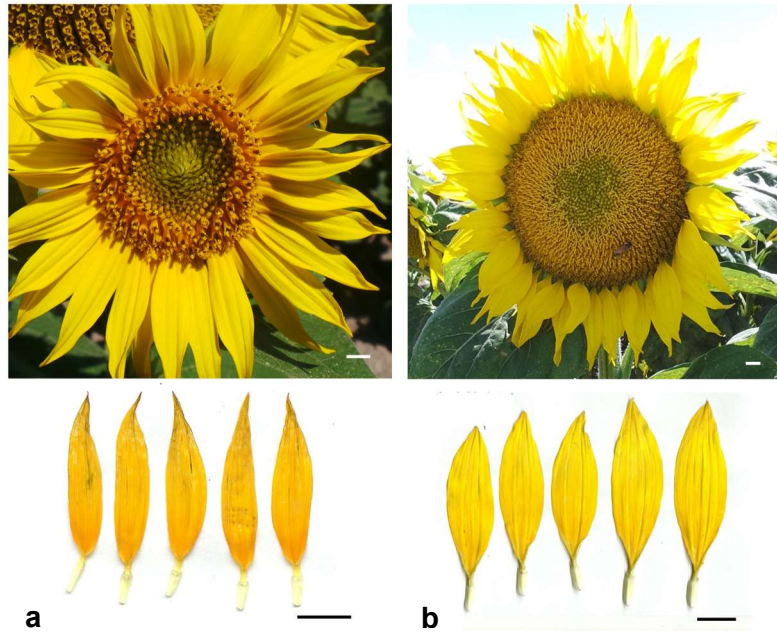


Figura 5.6: Capítulos y flores liguladas de los materiales en el lote AO; (a) línea androfertil MAO y (b) línea androestéril HAO. Barra: 1cm.

El ANOVA doble realizado para la variable NFL en los materiales T y CL, mostró una interacción no significativa ($F_{4,36} = 1,52$; $p = 0,2165$ y $F_{4,36} = 0,45$; $p = 0,7743$, respectivamente), por lo cual se observa en la Figura 5.7 a y b la comparación entre los genotipos utilizando el promedio de los estadios fenológicos estudiados. En el caso de los materiales AO la interacción fue significativa, por lo que estas comparaciones se presentan particionadas ($F_{2,24} = 2,54$; $p = 0,0995$, Figura 5.7 c).

Las líneas H2 y H2CL presentaron un NFL por capítulo inferior al resto de los parentales ($F_{2,36} = 17,78$; $p < 0,001$ y $F_{2,36} = 14,73$, $p < 0,001$; respectivamente). Dentro de los materiales T, la H1 resultó superior al material androfértil (Figura 5.7 a).

En el caso de los genotipos AO, en los tres estadios fenológicos el macho presentó menor número de flores liguladas ($F_{1,8} = 178,09$, $p < 0,0001$; $F_{1,8} = 108,31$, $p < 0,0001$; $F_{1,8} = 7,09$, $p = 0,0287$, para los EF R5.2, R5.5 y R5.8, respectivamente).

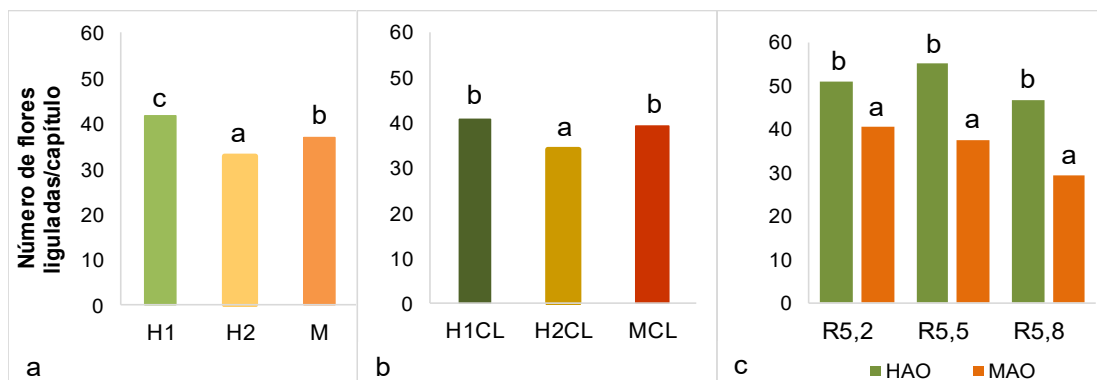


Figura 5.7: Número de flores liguladas/capítulo de los materiales genotipos: (a) Tradicionales, (b) Clearfield y (c) Alto oleico, en los EF R5.2, R5.5 y R5.8. En c se grafica la comparación entre genotipos separada por estadio fenológico debido a la presencia de interacción genotipo*estadio fenológico. Letras distintas indican diferencias significativas con un $p < 0,05$.

Los estadios fenológicos no presentaron diferencias respecto de este parámetro en los materiales T y CL, pero si en los AO ($F_{2,36} = 0,33$, $p = 0,7229$; $F_{2,36} = 0,07$, $p = 0,9295$ y $F_{2,24} = 13,27$, $p = 0,0001$).

Por último, además del diámetro del capítulo y la cantidad de flores liguladas, el área de las mismas es otro importante factor que define la imagen visual con la cual estas inflorescencias atraen a los polinizadores, ya sea a larga o a corta distancia.

El ANOVA doble presentó interacción significativa en los tres grupos de materiales genéticos evaluados. En la comparación entre genotipos, los machos presentaron un área de las flores liguladas inferior (Figura 5.8), lo cual se corresponde con el tamaño general de las plantas (Tabla 2.2 y 2.3) y los capítulos en este tipo de parental (Figura 5.2). Las H2, con y sin tecnología CL presentaron un área que, generalmente, no difirió del macho, pero si ampliamente respecto a las hembras del complejo H1 ($F_{2,12} = 59,14$, $p < 0,0001$; $F_{2,12} = 51,29$, $p < 0,0001$; $F_{2,12} = 31,55$, $p < 0,0001$, para materiales T; $F_{2,12} = 30,07$, $p < 0,0001$; $F_{2,12} = 117,79$, $p < 0,0001$, $F_{2,12} = 52,75$, $p < 0,0001$, para materiales CL en los EF R5.2, R5.5 y R5.8, respectivamente).

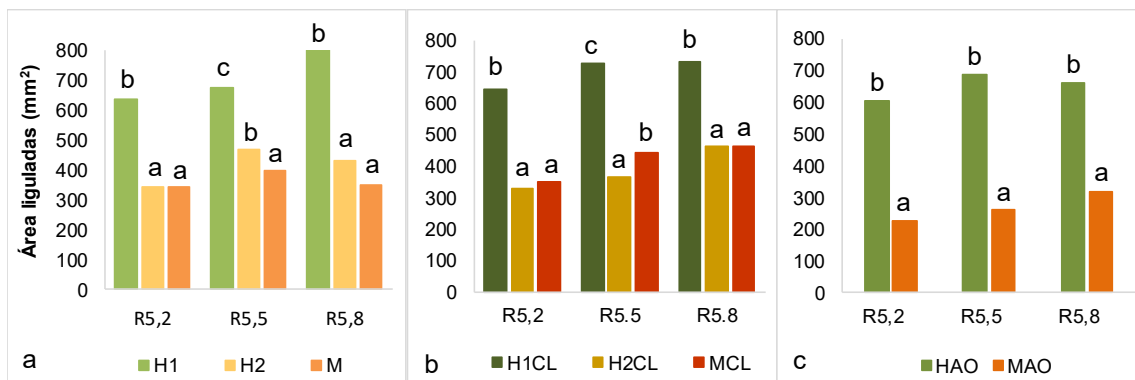


Figura 5.8: Área de las flores liguladas (mm^2) de los genotipos: (a) Tradicionales, (b) Clearfield y (c) Alto oleico, en los EF R5.2, R5.5 y R5.8. Se grafica la comparación entre genotipos separada por estadio fenológico debido a la presencia de interacción genotipo*estadio fenológico. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos con un $p < 0.05$.

Al respecto, Martín y Farina (2016) plantearon que las diferencias de aspecto entre líneas androfértiles y androestériles resultarían en un escaso movimiento de las abejas entre estos parentales, lo cual, es fundamental para que ocurra la fecundación. Estos autores observaron que, en lotes de producción de semilla de girasol, donde estas líneas presentaban menos diferencias morfológicas (altura de la planta y diámetro del capítulo), se daban mayores tasas de entrecruzamiento. Además, plantearon que el tamaño del capítulo, que en las hembras llegaba casi a duplicar al de los machos, aumentaba sustancialmente el tiempo de pecoreo resultando en una menor tasa de visitas con respecto a los materiales masculinos. Esta hipótesis podría plantear una ventaja de la H2 por el tamaño similar de liguladas con el macho, aunque cabe recordar, que el área registrada de las lígulas en este parental se debe principalmente a que están plegadas sobre sí mismas (Figura 5.4 c y 5.5

c). Esto determina que el aspecto de sus capítulos no sólo continúa siendo muy diferente, sino, que asemeja a un capítulo en estado de senescencia, lo cual podría resultar una señal muy contraproducente con respecto a la atractividad.

En la comparación entre estadios no se presentó una tendencia en común entre los genotipos. En algunos, el área pareció seguir en aumento con el progreso de los estadios fenológicos, aunque en otros no se encontraron diferencias significativas (Figura 5.9).

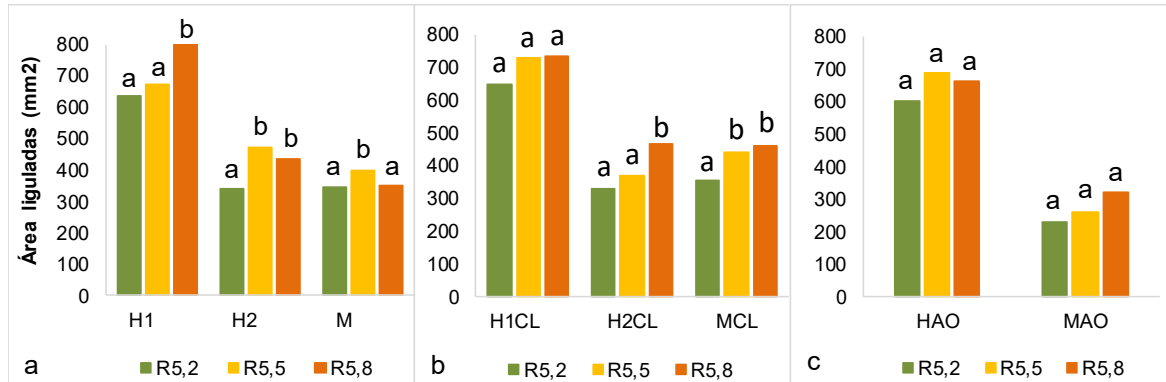


Figura 5.9: Área de las flores liguladas (mm²) en los EF R5.2, R5.5 y R5.8, para los genotipos: (a) Tradicionales, (b) Clearfield y (c) Alto oleico. Se grafica la comparación entre estadios separada por genotipo debido a la presencia de interacción genotipo*estadio fenológico. Letras distintas indican diferencias con un p<0.05.

El Área de las flores liguladas en los materiales H2CL2015 y MCL2015 se presenta en la Figura 5.10. En este lote de producción el material androfértil presentó un tamaño de flor ligulada menor al androestéril. Si bien esta comparación resultó en una tendencia diferente a la del año anterior, los promedios generales de Área de liguladas (mm²) fueron similares (H2CL = 385,9824 ± 71,3763; H2CL2015 = 473,7708 ± 76,3651 y MCL = 417,9031 ± 59,2894; MCL2015 = 304,5905 ± 40,6182).

La comparación entre EF no arrojó diferencias estadísticas respecto a este parámetro ($F_{2,24} = 1,14$, $p = 0,3379$).

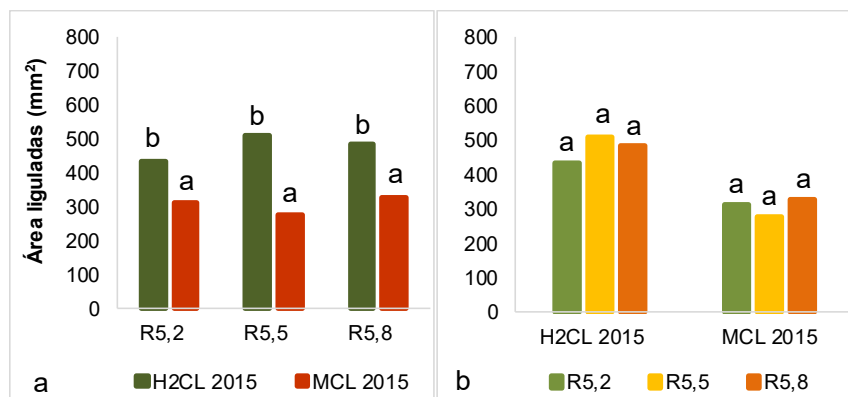


Figura 5.10: Área de las flores liguladas (mm²) a) Comparación entre genotipos, en los distintos estadios. b) Comparación entre estadios fenológicos en los materiales genéticos estudiados. Letras distintas indican diferencias con un p<0.05.

Como fue mencionado anteriormente, las flores liguladas en el material androestéril H2, tanto en la línea T como en la resistente al herbicida, presentan los bordes ondulados

reduciendo el área que se visualiza de estos órganos (Figura 5.9). Esta disminución de la superficie expuesta de las lígulas se manifiesta en la comparación entre el Área real y el Área potencial que se ilustra en la Figura 5.11. La tendencia se repitió en los tres muestreos y los valores medios fueron muy similares en los dos años de la hembra H2CL (Figura 5.11 b y c), mostrando la estabilidad de esta variable en años y sitios de producción distintos.

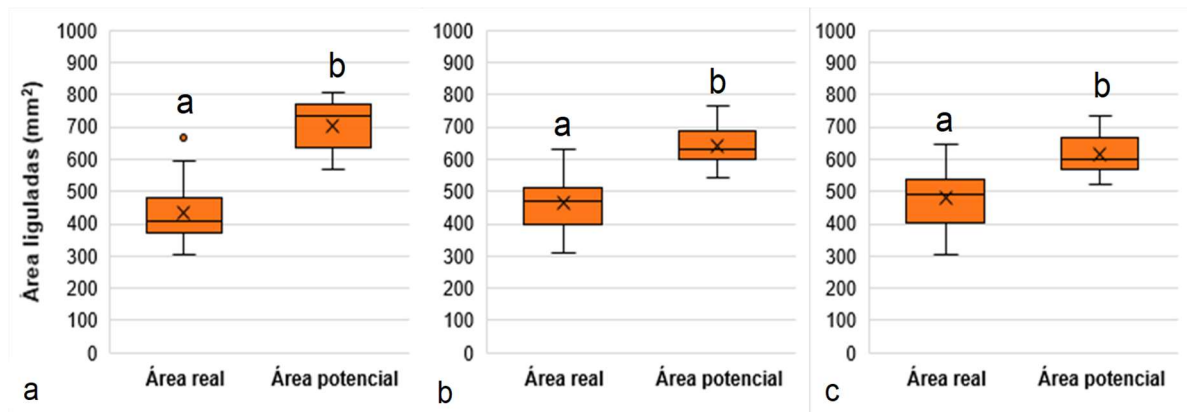


Figura 5.11: Gráficos de cajas y brazos para a) H2, b) H2CL y c) H2CL2015. Las cruces indican la mediana de la variable Área liguladas (mm²). Los brazos indican Q1 y Q3 el inferior y superior, respectivamente.

Tanto de la observación a campo como del resultado del análisis de las variables relacionadas con la atractividad surge que las líneas androestériles H2 presentaron menores atributos visuales relacionados a las flores liguladas que las H1 ya que no sólo tuvieron menor área de corola expuesta en cada flor, sino que también presentaron menor cantidad de las mismas por capítulo y esto se observó tanto en los materiales CL como T. Esto, plantea una estabilidad genética con respecto a este tipo de variable que no sólo se manifestó en la comparación entre los materiales que diferían únicamente de la tecnología incorporada, sino, en las características observadas en las plantas de H2CL2015, donde el año y sitio de producción no aportó una variación importante en el fenotipo observado. Dado que el diámetro del receptáculo no difirió entre estas hembras, las diferencias en el área de atracción visual estarían relacionadas con la cantidad y forma de las flores liguladas.

En el caso de los machos todos los genotipos presentaron menor tamaño general en sus plantas, lo cual se evidenció tanto en el diámetro del capítulo como en el tamaño de sus flores liguladas.

5.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS FLORES TUBULOSAS

5.4.1 Materiales y métodos

De cada uno de los 5 capítulos de cada genotipo en los EF R5.2, R5.5 y R5.8 que fueron cortados para registrar el diámetro del receptáculo y los parámetros medidos en las flores liguladas (Figura 5.1), se extrajeron al azar 5 flores tubulosas que se fijaron con solución FAA (formol-ácido acético-alcohol) para su conservación (Figura 5.1 b). El muestreo

de los tres estadios mencionados permitió obtener flores del sector externo (SE), medio (SM) e interno (SI) del disco. Las mismas fueron fotografiadas en el laboratorio con una lupa Leica EZ4D que permitió generar imágenes digitales calibradas, que luego de ser procesadas con el programa ImageTool, permitieron generar las siguientes variables (Figura 5.12):

- *Ancho de corola* (AC)
- *Largo de corola* (LC)
- *Largo de estigma* (LE)
- *Volumen estimado del nectario* (VEN): calculada a partir del largo y ancho del nectario (utilizando la fórmula de volumen de un cilindro). Si bien el nectario es un anillo y no un disco, la creación de esta variable permitió simplificar la interpretación de los datos.

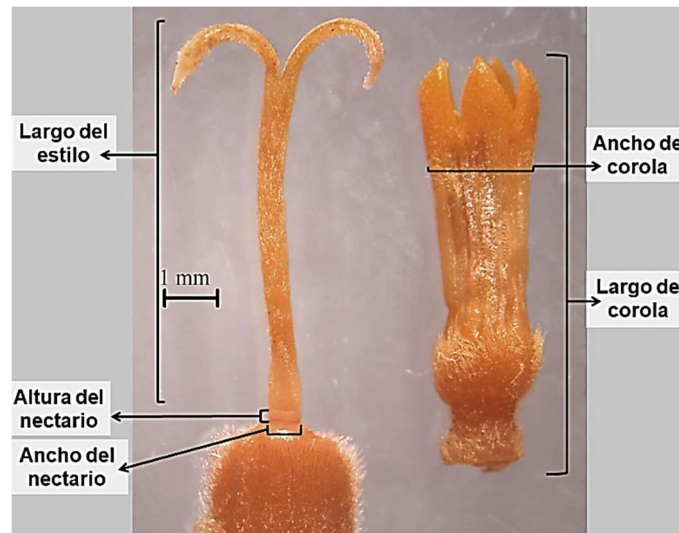


Figura 5.12: Parámetros evaluados en la porción epigina de una flor tubulosa a la que se retiró la corola.

Además, la morfología de las ramas estilares y zona estigmática, así como de los nectarios fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Para ello, se enviaron muestras de flores tubulosas desprovistas de sus corolas fijadas en FAA al Servicio de Microscopía Electrónica dependiente del CCT Bahía Blanca (CONICET), donde fueron procesadas siguiendo técnicas convencionales para MEB (Ruzin, 1999).

Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA doble para comparar los factores genotipos y sector del capítulo entre los materiales que compartían el mismo lote de producción y momento de colección de los capítulos, es decir, dentro de los materiales T, CL y AO correspondientes a cada muestreo. Las comparaciones entre medias se realizaron con el test LSD de Fisher con un nivel de significación del 0.05. Los datos correspondientes a cada flor fueron promediados ya que se demostró que aportaban un componente aditivo de varianza.

Finalmente, a través de un análisis multivariado se evaluó la relación entre los distintos materiales genéticos utilizados y las variables morfométricas medidas.

5.4.2 Resultados y discusión

Se presenta en la Figura 5.13 una flor tubulosa desprovista de su corola. En ella se observa (desde abajo hacia arriba) la parte superior el ovario ínfero, provisto de abundante pilosidad, el nectario en forma de disco en la base del estilo y a este último, culminando en dos ramas abiertas que exponen la superficie estigmática.

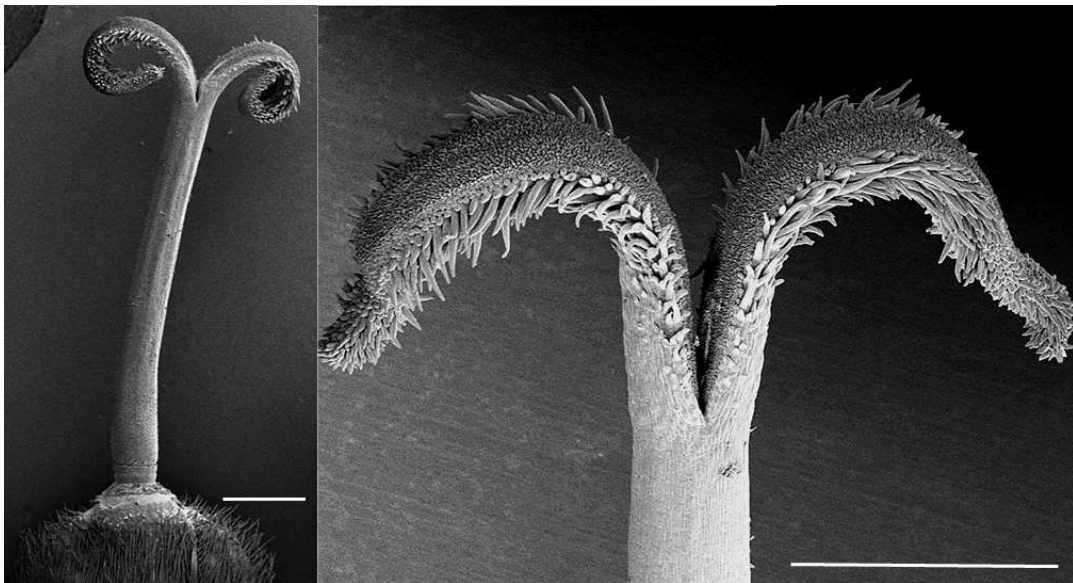


Figura 5.13: Imagen tomada con microscopio electrónico de barrido: disco del nectario en parte superior el ovario ínfero y estilo con las ramas desplegadas. Barra: 1mm.

Los estigmas tienen tres tipos de papilas que se diferencian por su tamaño (Figura 5.14). Las receptivas al polen, más cortas, se encuentran en la cara interna que permanece protegida cuando las ramas van juntas, ascendiendo y atravesando el tubo que forman las anteras soldadas entre sí (Sammataro, 1983; Wojtaszek y Maier, 2014).

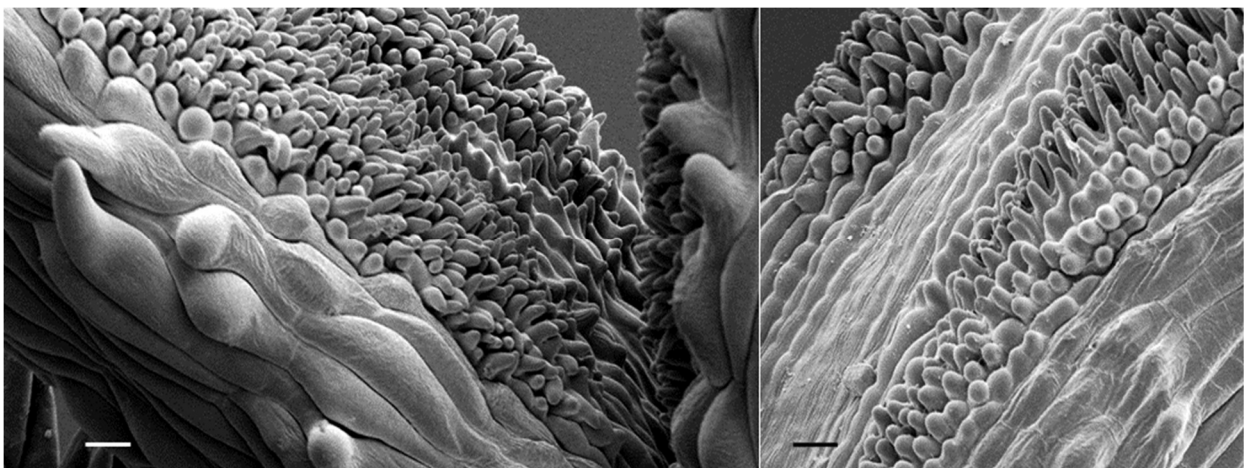


Figura 5.14: Papilas del área estigmática (imagen de microscopio electrónico de barrido). Barra: 20 μ m.

5.4.2.1 Ancho de corola

En los materiales T y los AO, en los cuales la interacción resultó no significativa ($F_{4,36} = 0,45$, $p = 0,77$; $F_{2,24} = 0,08$, $p = 0,92$, respectivamente), el gráfico muestra el promedio de los sectores para cada línea parental (Figura 5.15 a y c) mientras que en los materiales CL, en los cuales la interacción resultó significativa ($F_{4,36} = 4,16$; $p = 0,0071$), se muestran los valores de los tres sectores del capítulo (Figura 5.15 b).

En la comparación entre genotipos entre los materiales T y los CL, las líneas masculinas resultaron superiores ($F_{2,36} = 27,40$; $p < 0,001$ y $F_{2,14} = 22,99$, $F_{2,14} = 19,13$ y $F_{2,14} = 5,32$, $p < 0,01$ en los sectores SI, SM y SE del capítulo, respectivamente). En el caso de los materiales AO, fue la hembra la que presentó un AC mayor ($F_{1,24} = 8,94$; $p = 0,0063$).

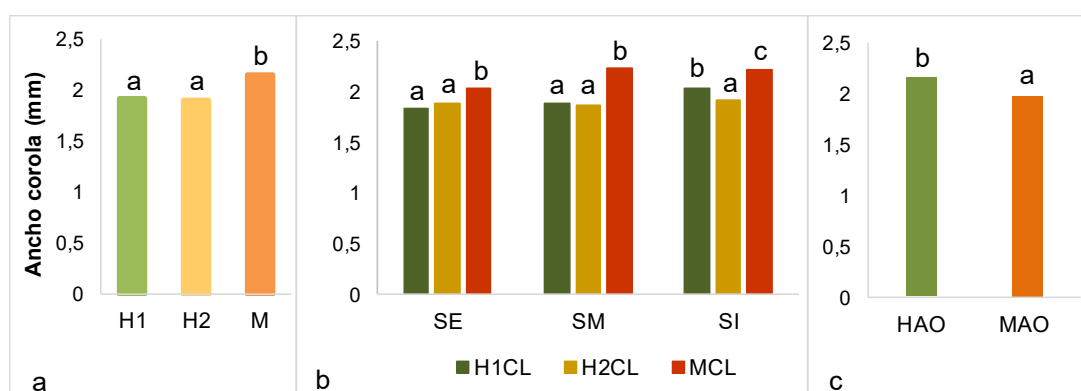


Figura 5.15: Ancho de corola de las flores tubulosas en los genotipos (a) Tradicionales; (b) Clearfield y (c) Alto oleico en los sectores del capítulo: SI (Sector interno), SM (sector medio) y SE (sector externo). En b se grafica la comparación entre genotipos separada por sector del capítulo debido a la presencia de interacción genotipo*sector del capítulo. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0,05$.

Respecto a la comparación entre sectores del capítulo dentro de los distintos genotipos, el SI fue, en general, el de las flores más anchas ($F_{2,36} = 25,23$, $p < 0,001$ para los materiales T y $F_{2,17} = 6,8$, $p = 0,0068$; $F_{2,17} = 0,36$, $p = 0,70$, $F_{2,17} = 4,55$, $p = 0,0319$ para H1CL, H2CL y MCL, respectivamente; Figura 5.16 a y b) a excepción de los materiales AO donde no se hallaron diferencias significativas ($F_{2,24} = 0,67$; $p = 0,52$; Figura 5.16 c).

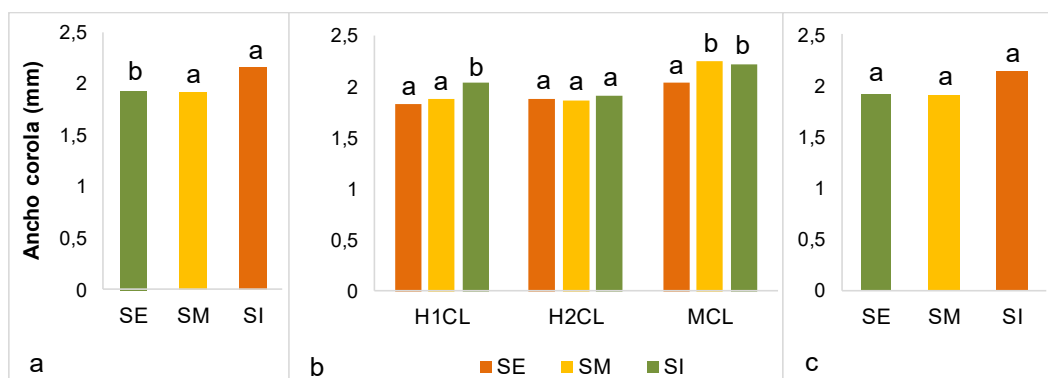


Figura 5.16: Ancho de corola de las flores tubulosas en los sectores del capítulo: SI (Sector interno), SM (sector medio) y SE (sector externo) de los genotipos (a) Tradicionales; (b) Clearfield y (c) Alto oleico. En b se grafica la comparación entre sectores separada por genotipo debido a la presencia de interacción genotipo*sector del capítulo. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0,05$.

Se observa en la Figura 5.17 el AC en los materiales H2CL2015 y MCL2015. Los gráficos muestran una tendencia similar en los dos años de muestreo a pesar de que el parental androfértil resultó significativamente superior sólo en las flores del sector externo del capítulo (Figura 5.17 a).

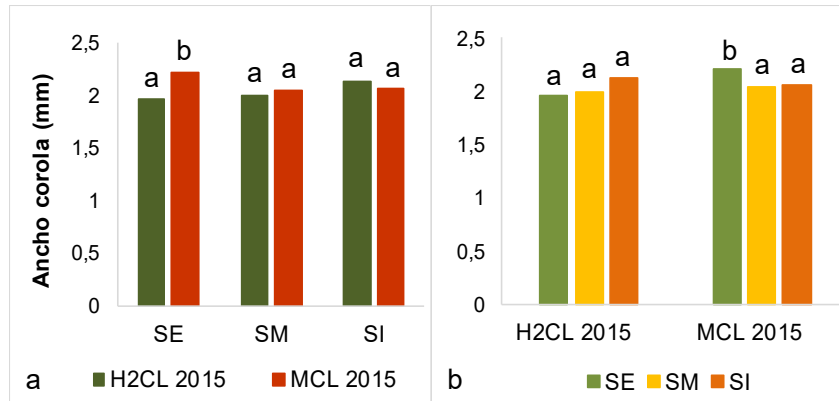


Figura 5.17: Ancho de corola (mm) de las flores tubulosas en los genotipos estudiados. a) Comparación entre genotipos, en los distintos sectores del capítulo (SI: Sector interno, SM: Sector medio y SE: Sector externo). b) Comparación entre sectores del capítulo en los materiales genéticos estudiados. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

5.4.2.2 Largo de corola

Este parámetro, al igual que el ancho, determinan la capacidad que va a tener el tubo de la corola de contener el néctar y, además, van a estar relacionados a la exposición al ambiente y disponibilidad para los polinizadores del mismo. Este parámetro varió en los genotipos estudiados entre valores promedio de 7,23 mm y 8,51 mm (mínimo y máximo), los cuales se encuentran cercanos a la media de la bibliografía consultada (Sammataro et al, 1983; Atlagic, 2003; Mallinger y Prasifka, 2017; Portlas, 2018; Whitted, 2019; Segarra, 2020). A su vez, estos valores resultaron próximos al tamaño de proboscis de la abeja, que se encuentra alrededor de los 6,3 - 7,4 mm (Waddington y Herbst 1987). Siendo este insecto el principal polinizador descrito en este sistema, la variable morfológica mencionada podría ser una barrera primaria de gran importancia que disminuya la atractividad de las líneas parentales.

El análisis estadístico en este parámetro no halló interacción entre el factor genotipo y sector del capítulo en ninguno de los grupos de parentales ($F_{4,36} = 1,7$; $p = 0,1711$, materiales T; $F_{4,36} = 1,67$; $p = 0,1772$, materiales Clearfield y $F_{2,24} = 0,39$; $p = 0,6818$, materiales AO). Se observa en los gráficos de la Figura 5.18, una tendencia general a mayor LC en los parentales masculinos, lo cual es coincidente con lo observado por Mallinger y Prasifka (2017). Las hembras H2, con y sin tecnología CL, presentaron corolas más cortas ($F_{2,36} = 3,5$; $p = 0,0407$, materiales T; $F_{2,36} = 173,59$; $p < 0,0001$, materiales CL). Esto nos permite inferir que la superficie del néctar contenido en la flor quedaría más cerca del límite superior de las mismas, por ende, más expuesto a las condiciones ambientales. Esto podría

estar relacionado a alta concentración que presentó el néctar en este parental androestéril (Figura 3.4).

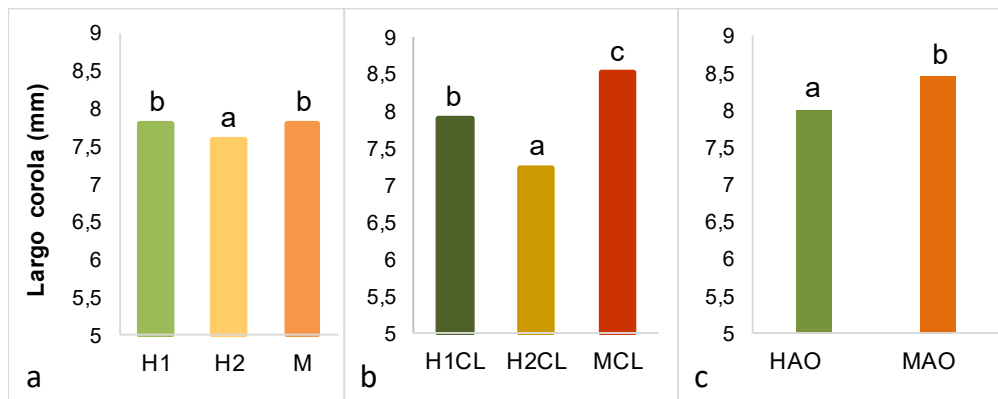


Figura 5.18: Largo de corola (mm) de las flores tubulosas en los genotipos (a) Tradicionales; (b) Clearfield y (c) Alto oleico. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

El mayor tamaño de las flores del disco observado en los machos podría resultar una característica negativa con respecto a la accesibilidad de la abeja al néctar, dado que como se ve en la Figura 5.18, en algunos parentales la corola supera los 8 mm de largo. Esto sumado al menor tamaño de planta, menor diámetro de capítulo y menor número de flores liguladas, podría provocar que estas líneas parentales resultaran menos atractivas, aunque cabe mencionar que la presencia de polen genera un atractivo muy importante por su color y aroma (Pernal y Currie, 2002).

Con respecto a los sectores del capítulo, se observa en la Figura 5.19 un mayor largo de las flores tubulosas hacia el centro del mismo, tendencia que se repite en los tres grupos de parentales estudiados ($F_{2,36} = 23,02$; $p < 0,0001$, materiales T; $F_{2,36} = 35,005$; $p < 0,0001$, materiales CL y $F_{2,24} = 4,14$; $p = 0,0285$, materiales AO).

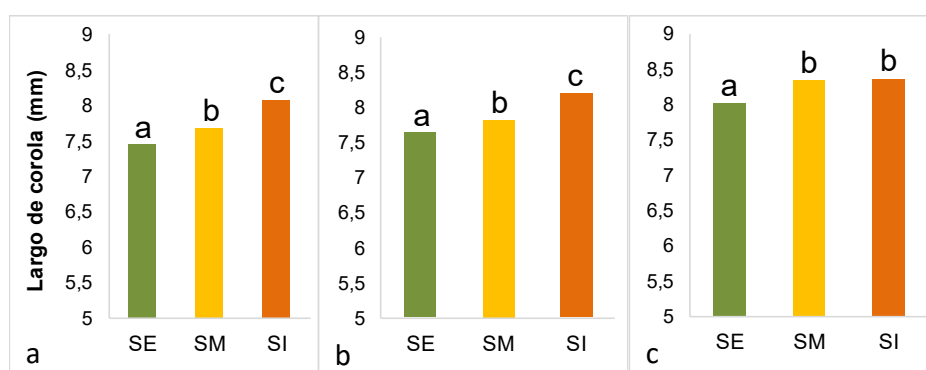


Figura 5.19: Largo de corola (mm) de las flores tubulosas en tres sectores del capítulo muestreados: SI-sector interno, SM-sector medio y SE-sector externo, en los genotipos (a) Tradicionales; (b) Clearfield y (c) Alto oleico. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

El LC presentó en el muestreo adicional del año 2015 la misma tendencia que en el año 2014: una marcada superioridad del material androfértil y de las flores del centro del capítulo (Figura 5.20).

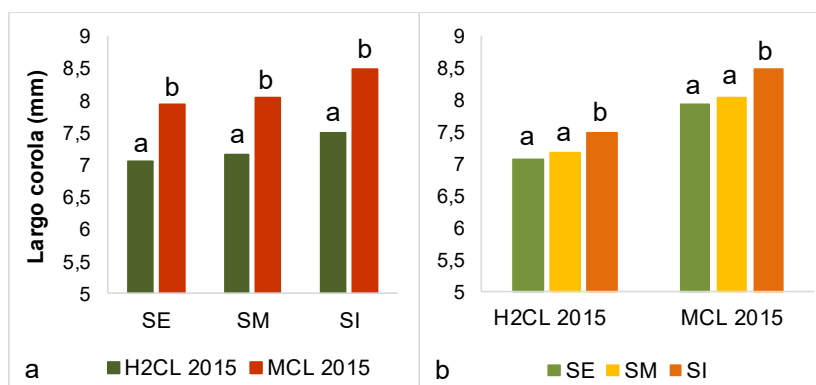


Figura 5.20: Largo de corola (mm) de las flores tubulosas en los genotipos estudiados. a) Comparación entre genotipos, en los distintos sectores del capítulo (SI-sector interno, SM-sector medio y SE-sector externo). b) Comparación entre sectores del capítulo en los materiales genéticos estudiados. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

5.4.2.3 Largo del estilo

En el ANOVA doble la interacción resultó significativa en los materiales T ($F_{4,36} = 5,6$; $p = 0,0013$), mientras que en los genotipos CL y los AO la interacción resultó no significativa ($F_{4,36} = 1,35$; $p = 0,27$; $F_{2,24} = 0,26$; $p = 0,7739$, respectivamente; Figura 5.21 y 5.23).

Respecto a la comparación entre genotipos, se observa en la Figura 5.21 que el LE resultó superior en las hembras del complejo H2, tanto en los materiales T como en los CL. Estos resultados adicionan aspectos negativos a las características morfológicas ya descritas, las cuales podrían dificultar la polinización.

No se hallaron diferencias significativas entre los dos genotipos AO respecto a este parámetro ($F_{1,24} = 0,03$; $p = 0,87$).

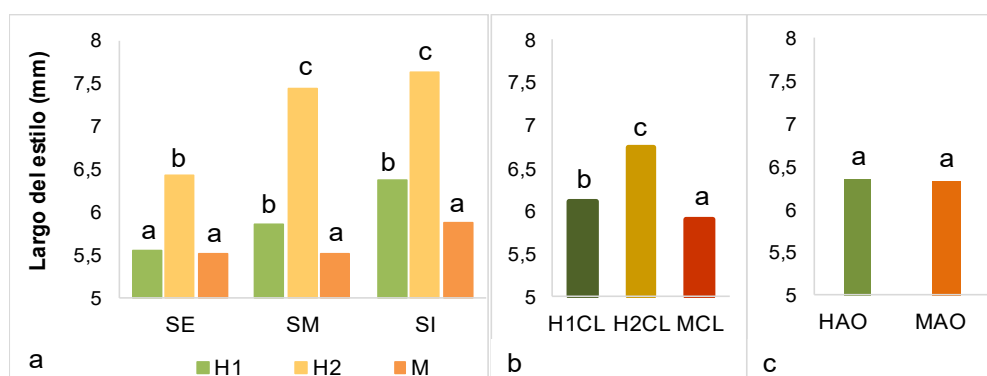


Figura 5.21: Largo del estilo de las flores tubulosas (mm) de los genotipos (a) Tradicionales; (b) Clearfield y (c) Alto oleico en los sectores del capítulo: SI (Sector interno), SM (sector medio) y SE (sector externo). En a se grafica la comparación entre genotipos separada por sector del capítulo debido a la presencia de interacción genotipo*sector del capítulo. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

Este es uno de los parámetros medidos que más directamente se relaciona con el proceso de polinización a través de la mecánica del pecoreo de las abejas. Dada la morfología de las flores tubulosas, la abeja introduce su proboscis en la garganta de la corola para extraer el néctar ya que, al tratarse de una corola gamopétala, no puede realizarlo por un lateral de la misma. Es en este momento, cuando toca con el frente de la cabeza la cara

interna (estigmática) de la rama del estilo, le transfiere los granos de polen que lleva adheridos en los pelos que la recubren (Figura 5.22). A mayor espacio generado entre el límite de la corola (más corta en las H2) y el largo de los estilos (más largos en estas hembras), existe mayor probabilidad de que la abeja no haga contacto con las áreas estigmáticas al coleccionar el néctar, evitando así depositar los granos de polen.

Además, el largo del estilo puede definir el éxito de fecundación en relación al volumen del grano de polen y, por ende, la capacidad energética de generar un tubo polínico lo suficientemente largo como para atravesar dicha longitud (Torres, 2000).

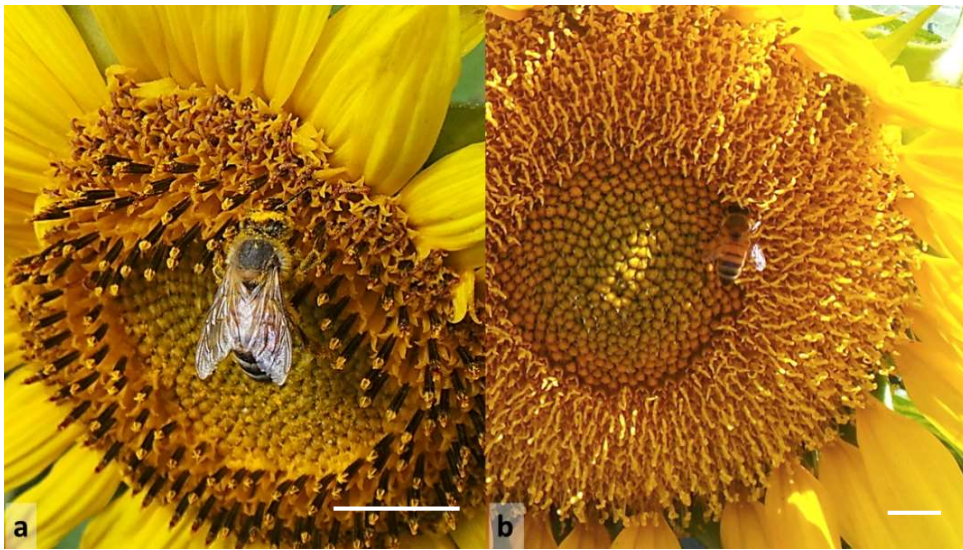


Figura 5.22: *Apis mellifera* L. pecoreando en ambas líneas parentales de Girasol. a) Abeja con la cabeza cubierta de polen pecoreando en línea androfértil. b) Abeja pecoreando en línea androesteril. Barra: 1cm.

En relación a los sectores del capítulo, las flores del sector interno en general presentaron estilos más largos ($F_{2,12} = 23,002$; $p = 0,0001$ y $F_{2,12} = 24,38$; $p = 0,0001$ en las líneas H1 y H2, respectivamente; $F_{2,36} = 41,206$, $p < 0,0001$, en materiales CL y $F_{1,24} = 25,4973$; $p < 0,0001$ en AO) a excepción del material androfértil T donde no se hallaron diferencias significativas entre sectores ($F_{2,12} = 2,53$; $p = 0,1211$) (Figura 5.23).

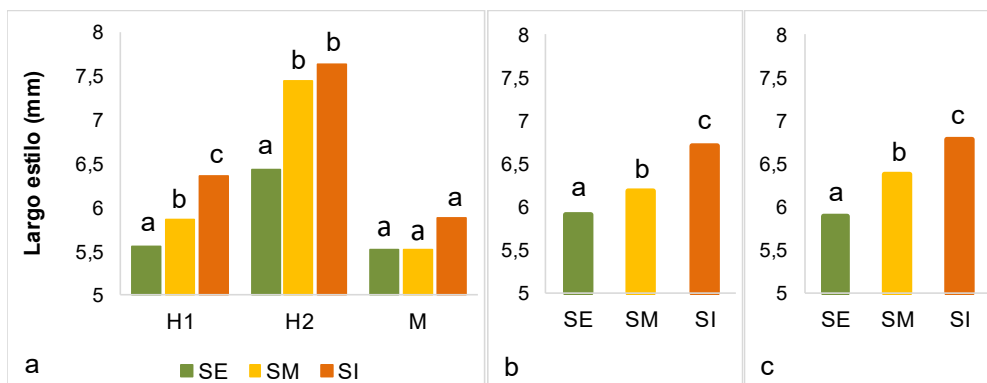


Figura 5.23: Largo del estilo de las flores tubulosas (mm) en los sectores del capítulo: SI-sector interno, SM-sector medio y SE-sector externo de los genotipos (a) Tradicionales; (b) Clearfield y (c) Alto oleico. En a se grafica la comparación entre sectores separada por genotipo debido a la presencia de interacción genotipo*sector del capítulo. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

Esta variable también presentó la misma tendencia en capítulos de H2CL2015 y MCL2015: resultaron más largos los estilos de las flores del parental femenino y las del sector interno del capítulo (Figura 5.24).

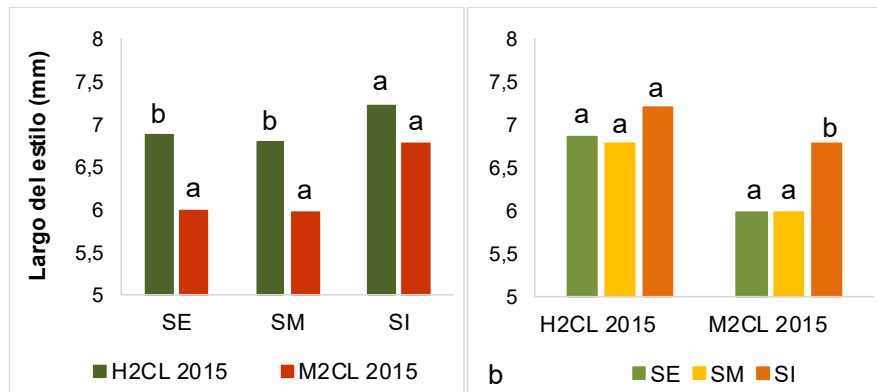


Figura 5.24: Largo de estilo (mm) de las flores tubulosas en los genotipos estudiados. a) Comparación entre genotipos, en los distintos sectores del capítulo (SI: Sector interno, SM: Sector medio y SE: Sector externo). b) Comparación entre sectores del capítulo en los materiales genéticos estudiados. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

5.4.2.4 Volumen de los nectarios

Este parámetro está estrechamente relacionado a la secreción de néctar. Los tamaños de nectarios observados fueron coincidentes con los descritos por Sammataro et al. (1985) en un trabajo realizado en líneas parentales.

Se observa en la Figura 5.25 que, nuevamente, las hembras del complejo H2 presentaron características que podrían repercutir negativamente en la polinización, en este caso, relacionadas a la secreción de néctar. En la comparación entre los materiales del 2014, las flores del complejo H2 fueron las que presentaron los nectarios más pequeños. Considerando que el volumen de tejido nectarífero tiene una relación directa con el volumen de néctar secretado (Petanidou et al., 2000), se podría inferir una relación entre esta característica del nectario y los bajos valores de néctar secretado por flor presentados por este material.

El análisis estadístico presentó interacción significativa en los materiales T y CL ($F_{4,36} = 1,98$; $p = 0,1177$; $F_{4,36} = 2,57$; $p = 0,0546$, respectivamente) por lo cual, se presentan particionadas las comparaciones de los dos factores que componen el ANOVA doble (Figura 5.25 y 5.26).

En general, la comparación entre genotipos arrojó que los machos exhibieron los nectarios más voluminosos tanto en los materiales T ($F_{2,12} = 14,93$; $p = 0,0006$; $F_{2,12} = 8,42$; $p = 0,0052$ y $F_{2,12} = 22,91$; $p = 0,0001$, para el SI, SM y SE, respectivamente) como en los CL ($F_{2,12} = 30,52$; $p < 0,0001$; $F_{2,12} = 30,52$; $p < 0,0001$ y $F_{2,12} = 19,09$; $p = 0,0002$, para el SI, SM y SE, respectivamente). Con respecto a los materiales AO, la hembra fue la que presentó mayor VEN ($F_{1,24} = 19,05$; $p = 0,0002$) (Figura 5.25 c).

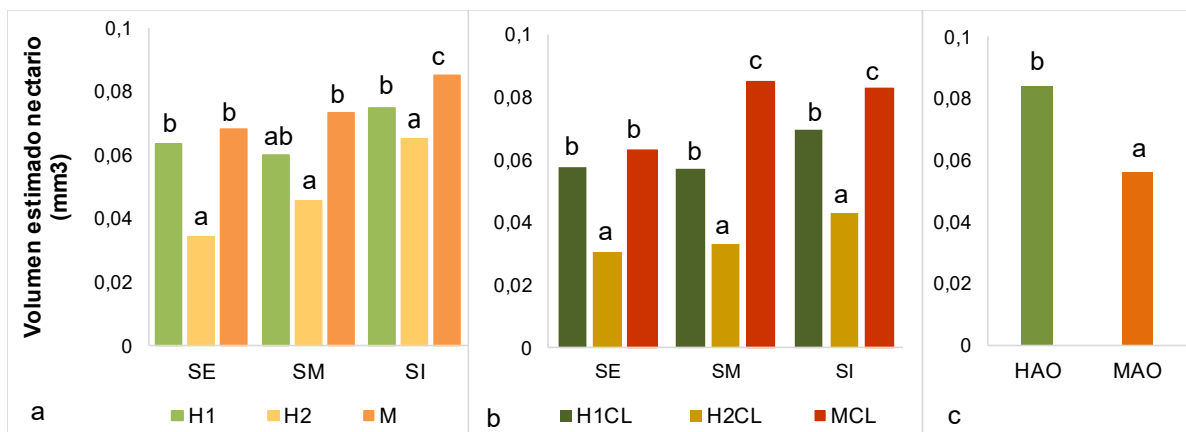


Figura 5.25: Volumen promedio del nectario de las flores tubulosas (mm^3) de los genotipos (a) Tradicionales; (b) Clearfield y (c) Alto oleico en los sectores del capítulo: SI-sector interno, SM-sector medio y SE-sector externo. En a y b se grafica la comparación entre genotipos separada por sector del capítulo debido a la presencia de interacción genotipo*sector del capítulo. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

Para finalizar, la media de este parámetro resultó superior hacia el interior del capítulo en la mayoría de los materiales estudiados (Figura 5.26).

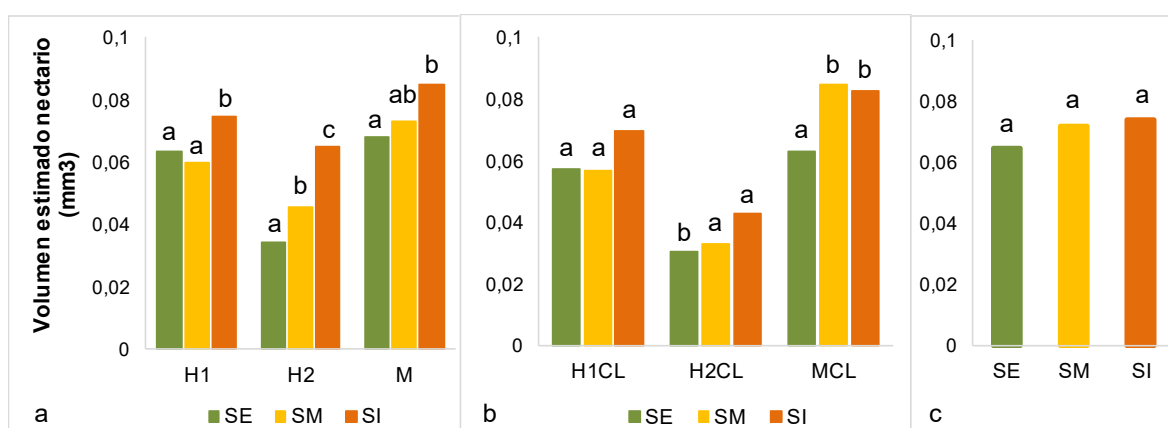


Figura 5.26: Volumen del nectario de las flores tubulosas (mm^3) en los sectores del capítulo: SI-sector interno, SM-sector medio y SE-sector externo de los genotipos: a, Tradicionales, b, Clearfield y c, Alto oleico. En a y b se grafica la comparación entre sectores separada por genotipo debido a la presencia de interacción genotipo*sector del capítulo. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

En el muestreo adicional de los nectarios de H2CL2015 y MCL2015, nuevamente el material androfértil presentó un VEN superior al androestéril, mostrando, también, estabilidad en este carácter morfológico (Figura 5.27 a). Respecto a los sectores del capítulo, H2CL2015 presentó la misma tendencia observada en 2014 (mayor VEN en las flores del centro), mientras que el material androfértil no mostró este comportamiento (Figura 5.27 b).

Con esta última característica expuesta, se concluye que las flores del centro del capítulo presentan mayor tamaño que las externas, considerando no sólo las corolas sino también el largo del estilo y el tamaño del nectario. Esta conclusión resulta novedosa, aunque difiere de la escasa bibliografía encontrada sobre el tema. Sinsawat (1993) en un estudio en el cual evaluó el área y peso de las flores tubulosas en condiciones restrictivas de luz y nitrógeno, planteó la hipótesis de una mayor dimensión de las flores del disco en

sentido centrífugo. Los fundamentos de este autor se basaron en la supuesta competencia por espacio que existe entre las flores dentro del capítulo y un posible efecto que tendría la vascularización del receptáculo. La primera justificación podría apoyarse en que las flores centrales, al abrir en los últimos estadios de floración, podrían sufrir cierta presión de las flores ya desarrolladas, por lo cual, serían más pequeñas. Respecto a la vascularización, Alkio et al. (2002) señalaron al transporte de los fotoasimilados como la causa del tamaño teóricamente menor de las flores centrales, planteando que, al inicio del desarrollo de los primeros frutos, el transporte comenzaría a ser prioritario para éstos, por lo cual, las flores centrales se verían perjudicadas.

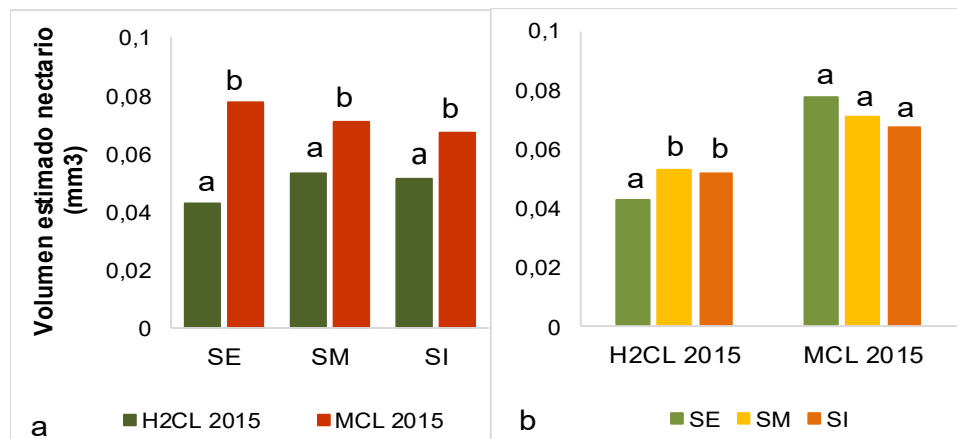


Figura 5.27: Volumen del nectario (mm) de las flores tubulosas en los genotipos estudiados. a) Comparación entre genotipos, en los distintos sectores del capítulo (SI: Sector interno, SM: Sector medio y SE: Sector externo). b) Comparación entre sectores del capítulo en los materiales genéticos estudiados. Letras distintas indican diferencias con un $p < 0.05$.

En el caso de los materiales estudiados en esta tesis, las condiciones de desarrollo de las plantas no fueron restrictivas como las planteadas por los autores mencionados, por lo que no se esperaría una competencia entre las flores del capítulo por espacio o por fotoasimilados. Dado que se evaluaron distintos genotipos tanto androfértiles como androestériles, en distintos tipos de producción y en todos los casos las flores del centro resultaron de mayor tamaño que las exteriores, estos datos resultan relevantes y si bien no pudieron apoyarse con otros trabajos publicados, merecen ser ampliados en futuras investigaciones.

Las imágenes de MEB de los nectarios mostraron que la cantidad de estomas en la superficie de los mismos difería entre los genotipos. En los tres genotipos androfértiles estudiados, se aprecian estomas en las caras internas y externas del nectario (Figura 5.28).

Por su parte, las imágenes de los nectarios de los materiales androestériles mostraron que los estomas sólo se localizan en el borde superior de anillo (Figura 5.29). Estas diferencias de distribución fueron descritas por Sammataro (1985) pero en su trabajo no estuvieron asociadas a las líneas androfértiles y androestériles, sino que variaron entre

líneas, independientemente del sexo. Davis (2001) menciona que, cuando los estomas están ubicados en la cara superior del nectario, se asocian a una menor secreción de néctar, no pudiendo respaldarse esta información con estudios más recientes y realizados en otros genotipos.

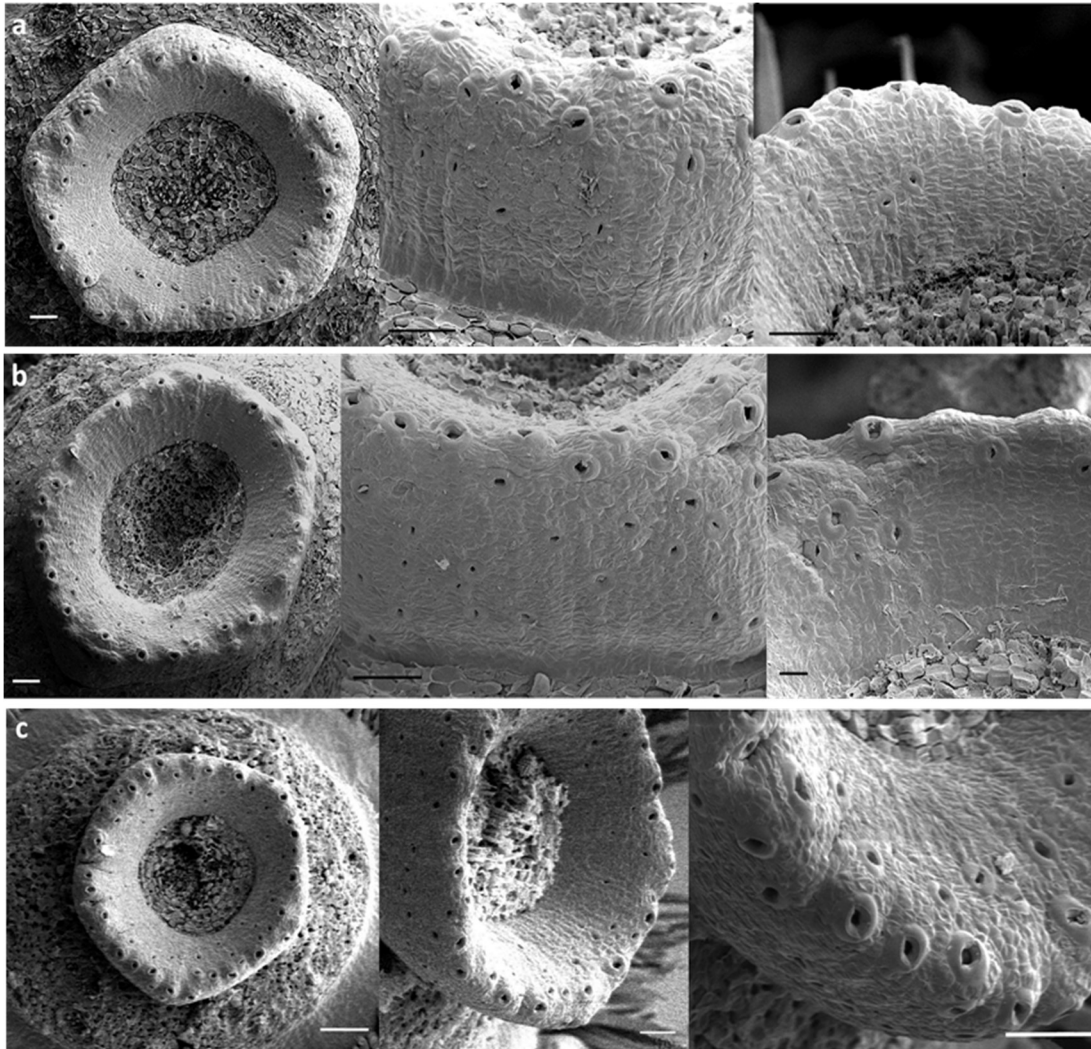


Figura 5.28: Fotos de microscopía electrónica de barrido de los nectarios de los genotipos androfértiles. Vistas frontales y laterales donde se visualiza la pared interna y externa del disco nectarífero en los genotipos a) M tradicional; b) MCL y c) MAO. La barra representa 50 μm .

Si bien la cantidad de estomas no fue contabilizada, en apariencia, los nectarios de las H2 muestran en la cara frontal menor cantidad de estomas que las H1 (Figura 5.29 c y d). En tal sentido es importante aclarar que no existe consenso en la bibliografía consultada sobre la relación entre la cantidad de estomas y el volumen de néctar secretado. Mientras algunos autores afirman que el volumen de néctar no estaría relacionado a la cantidad de estomas (Petanidou et al., 2000; Teuber et al., 1980; Davis & Gunning, 1993), ya que no todos los estomas secretan néctar (Gaffal et al., 1998), otros opinan lo contrario (Galletto, 1995).

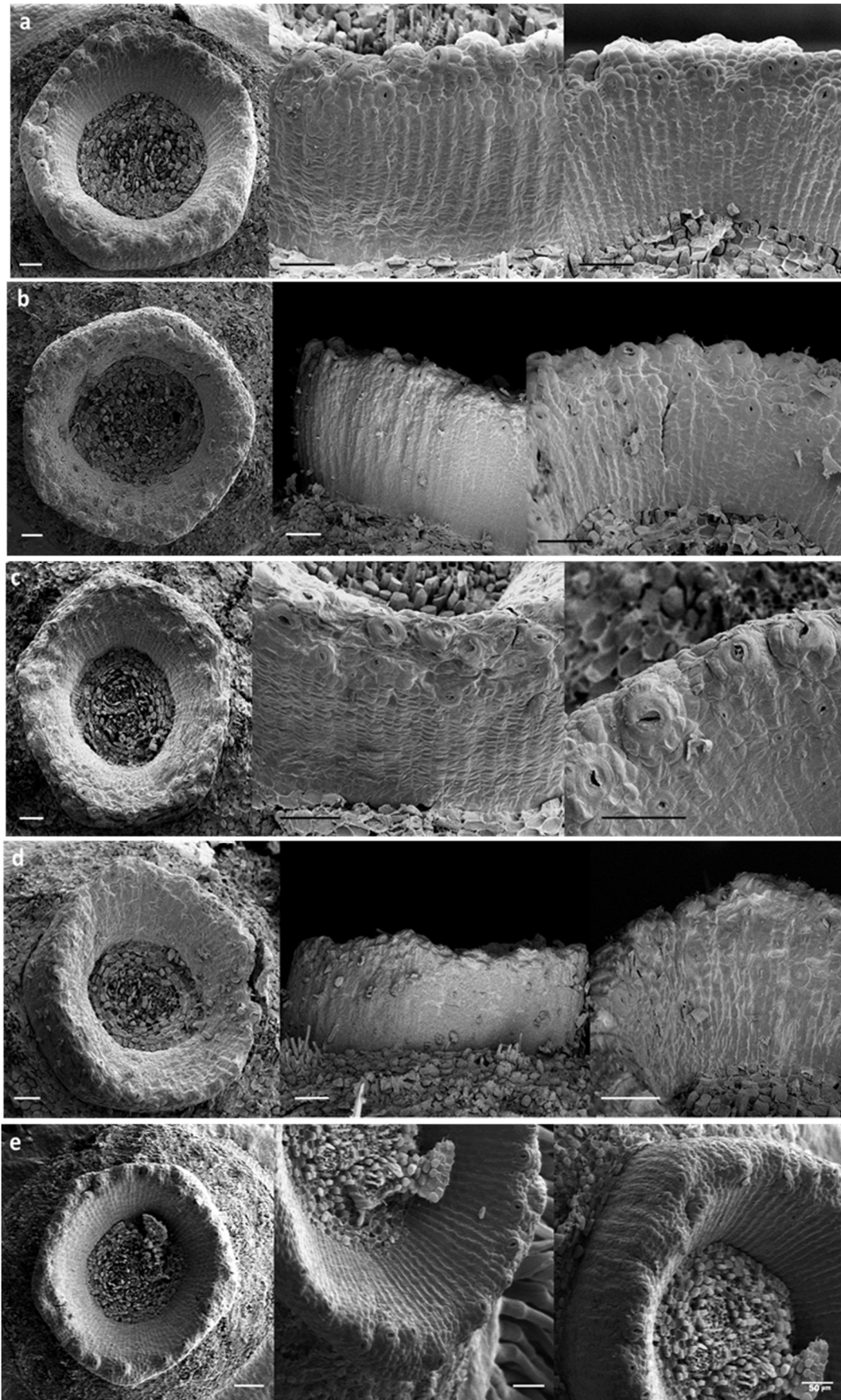


Figura 5.29: Fotos de microscopía electrónica de barrido de los nectarios de los genotipos androestériles. Vistas frontales y laterales donde se visualiza la pared interna y externa del disco nectarífero en los genotipos a) H1; b) H1CL; c) H2; d) H2CL y e) HAO. La barra de escala representa 50 micrones.

Todos estos parámetros expuestos de las flores tubulosas, tal como en el caso de las flores liguladas, indican que las flores de las H2 presentaron características desventajosas relacionadas al largo de la corola, del estilo y al tamaño de los nectarios que se repiten en los dos años y sitios de producción.

5.5 INTEGRACIÓN DE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS DE LOS MATERIALES GENÉTICOS

El análisis de componentes principales realizado con las variables número y área de flores liguladas y diámetro del receptáculo permite observar una estrecha relación entre los genotipos H1 y H1CL, H2 y H2CL y los materiales androfértiles M y MCL, que se visualiza con la proximidad de los puntos encerrados dentro de las elipses (Figura 5.30).

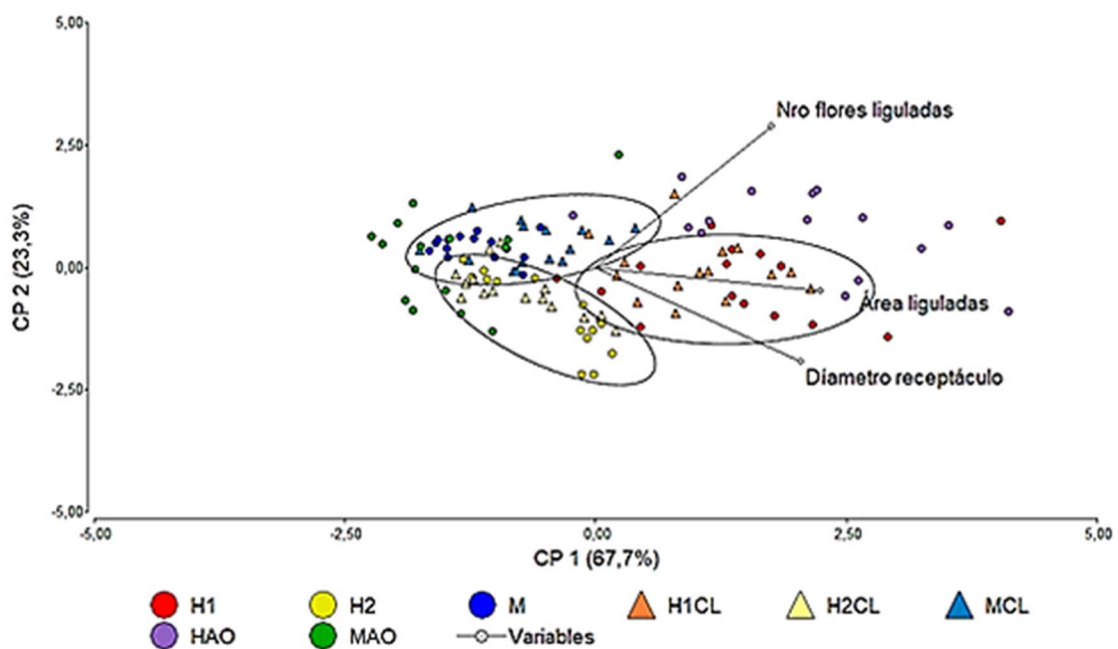


Figura 5.30: Gráfico multivariado correspondiente al análisis de componentes principales de todos los materiales estudiados y las variables Diámetro del capítulo, Número de flores liguladas y área de las mismas.

Las dos componentes principales en conjunto permiten explicar el 91 % de la variabilidad. La lectura de los autovectores indica que la CP1, que contiene el 67,7% de la variabilidad total, está asociada en sentido positivo al área y la CP2, al número de flores liguladas (Tabla 5.1). Esto determina lo que se observa en la ubicación a la derecha del gráfico en los puntos correspondientes a las hembras del complejo H1 (H1 y H1CL), asociadas a mayor área de liguladas, y a la izquierda y en el sector superior, donde se ubican los puntos del complejo M (M y MCL) caracterizados por menor área de liguladas y mayor número de las mismas, reafirmando los resultados indicados en el ANOVA.

Tabla 5.1: Autovectores de las variables estudiadas para las componentes principales 1 y 2.

Variables	CP 1	CP 2
Diámetro capítulo	0.83	-0,46
Nro. flores liguladas	0,71	0,69
Áreas liguladas	0.91	-0,11

En el análisis multivariado realizado para las flores tubulosas, como ocurrió con las flores liguladas, se observó una cercanía de los materiales genéticos H2 con H2CL, de H1 con H1 CI, y de los materiales androfértiles M con MCL (Figura 5.31). En el caso de este tipo de flor, el material androfértil AO mostró mayor cercanía a las hembras H1 que a los machos restantes.

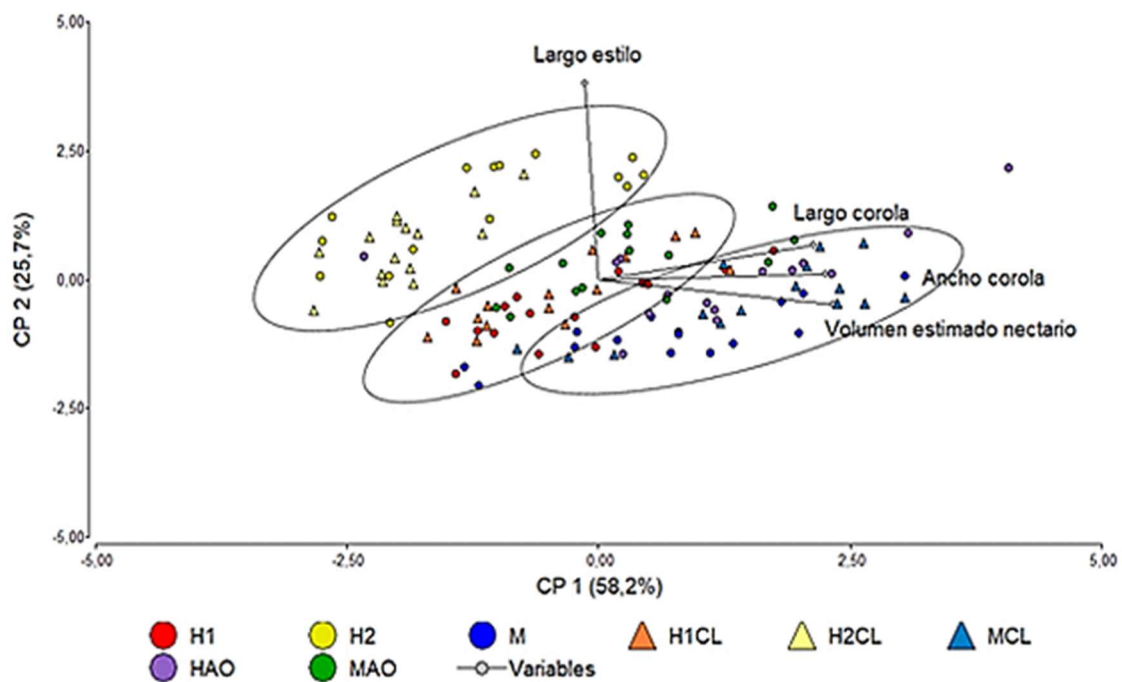


Figura 5.31: Gráfico multivariado correspondiente al análisis de componentes principales de todos los materiales estudiados y las variables Largo y ancho de corola de las flores tubulosas, Largo del estilo y Volumen estimado del nectario.

Las dos componentes principales en conjunto permiten explicar el 83.9 % de la variabilidad. La lectura de los autovectores indica que la CP1, conteniendo el 58.2 % de la variabilidad total, está asociada de manera positiva al tamaño de la corola y nectario. Podemos ver en este sentido, a diferencia de lo observado para las flores liguladas, una superioridad en tamaño de los materiales androfértiles que se ubicaron hacia la derecha del gráfico. La componente 2 resultó estar fuertemente asociada de manera positiva al largo del estilo, lo que define que las hembras del grupo H2 se aparten de las restantes, aparentemente, por presentar una medida promedio mayor con respecto a ese parámetro (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: Autovectores de las variables estudiadas para las componentes principales 1 y 2.

Variables	CP 1	CP 2
Ancho corola	0,89	0,02
Largo corola	0,84	0,18
Largo estilo	- 0,05	0,99
Volumen estimado nectario	0,92	-0,12

El análisis de conglomerados permitió agrupar los genotipos que resultaron cercanos en cuanto a todas las variables morfológicas medidas (Figura 5.32). Se utilizó la distancia Eúclidea y como método, el de agrupamiento promedio, ya que con los mismos se obtuvo la mayor correlación cofenética (0.867). Se fijó un criterio de corte arbitrario en la distancia 2,21 representando el 50% de la distancia máxima (Balzarini M., 2015), lo que arrojó la cercanía de los genotipos M y MCL, H1 y H1CL y H2 y H2CL, tal como se había observado en los componentes principales presentados anteriormente.

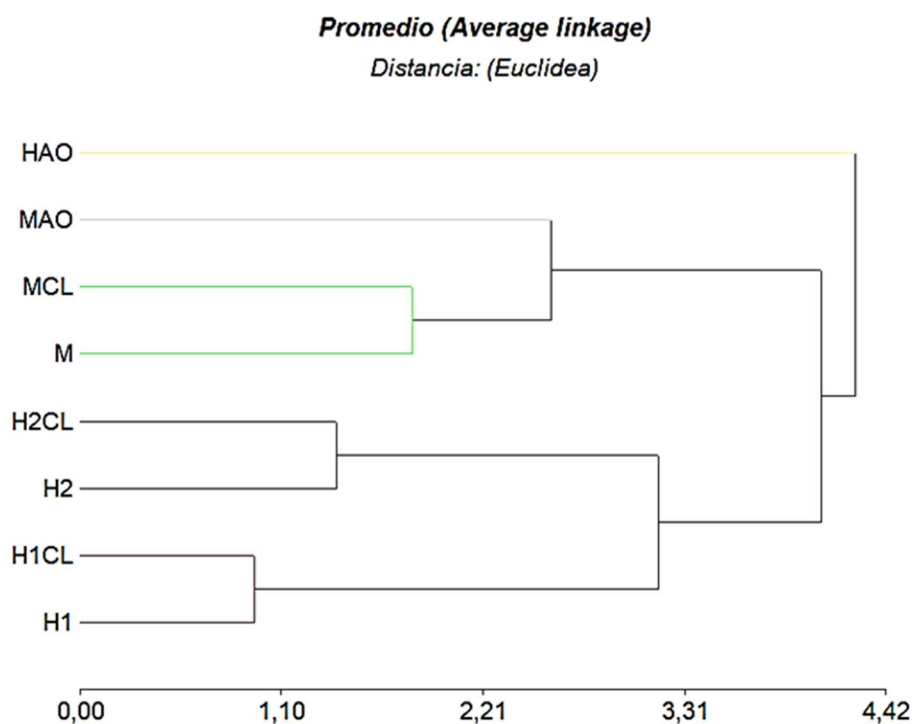


Figura 5.32: Dendrograma del análisis de conglomerados de los ocho genotipos estudiados para las variables morfométricas medidas: diámetro del receptáculo, área y número de las flores liguladas, largo y ancho de corola de las flores tubulosas, largo del estilo y volumen estimado del nectario.

5.6 CONCLUSIONES

- En los tres sistemas de producción estudiados las líneas masculinas presentaron menor diámetro de los capítulos y área de las flores liguladas que las líneas femeninas. Esto genera una diferencia visual manifiesta entre las líneas de siembra

de cada parental que podría influir en el movimiento de los polinizadores en los lotes de producción.

- La cantidad, tamaño y aspecto senescente de las flores liguladas son características que podrían operar de manera negativa en la atractividad a distancia de las hembras del complejo H2.
- Las corolas más cortas y estilos más largos descritos en las H2, podrían ofrecer limitaciones en la mecánica de polinización.
- Las hembras H2 presentaron nectarios de menor tamaño que las hembras con que fueron comparadas. Este volumen reducido de tejido secretor podría asociarse al volumen de néctar secretado por sus flores.
- Los parámetros morfométricos medidos resultaron en general de mayor dimensión en las flores del centro del capítulo, siendo esto un aspecto interesante a profundizar evaluándolo en conjunto con otras recompensas que fueron registradas anteriormente en esta posición del capítulo.
- El análisis de conglomerados realizado con las variables morfométricas estudiadas reflejó la preponderante cercanía genética por sobre la mejora tecnológica incorporada por mejoramiento. prevalece

CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE LAS VISITAS

6.1 INTRODUCCIÓN

La interacción planta-polinizador desempeña un papel importante en la evolución floral y en la especialización de las plantas, procesos mediados por las preferencias de los polinizadores a uno o un conjunto de rasgos florales (van der Pijl, 1961; Aigner, 2006; Harder y Johnson, 2009). Sin duda, la evolución floral tiene una relación directa con la de las especies vegetales ya que pocos aspectos de un organismo están tan sujetos a la selección natural como aquellos que afectan directamente su éxito reproductivo (Simón-Porcar et al., 2018). De esta manera, la ecología evolutiva se apoya en el principio del polinizador más eficiente, el cual, justamente, postula que la selección favorece aquellos rasgos de las plantas que sirvan para atraer a los visitantes florales que polinizan más eficientemente (Stebbins, 1970; Faegri y van der Pijl, 1979; Johnson y Steiner, 2000).

Bajo esta mirada, transcurrido el tiempo necesario, la mayoría de los sistemas de polinización deberían tender hacia la especialización (Ollerton, 1999; Johnson y Steiner, 2000). Sin embargo, los datos de campo muestran que los sistemas de polinización generalistas son más frecuentes de lo que estas teorías podrían predecir ya que las flores de muchas especies son visitadas por un grupo numeroso y taxonómicamente diverso de insectos (Dilley et al. 2000; Gomez et al., 2015; McCarthy et al., 2016; Thompson, 2001). Esto no implica necesariamente, que no exista presión de selección. Por el contrario, algunos autores sostienen que, en escenarios ecológicos adaptados a un grupo de polinizadores taxonómicamente heterogéneo pero ecológica y selectivamente homogéneo, la selección natural provocada por los mismos puede promover sistemas de polinización generalistas (Gómez, 2002).

Estos aspectos de la coevolución parecen muy lejanos a las especies cultivadas, las cuales presentan una presión de selección antrópica más fuerte que la realizada por los polinizadores espontáneos. Sin embargo, la misma selectividad que opera en la selección natural es la que define la eficiencia de polinización en los cultivos, y se relaciona a las recompensas que éstos brindan y a los recursos florísticos del paisaje adyacente.

El papel incuestionable de los insectos polinizadores, y fundamentalmente el de las abejas, ha sido ampliamente demostrado para la polinización de muchos tipos de cultivos (Giannini et al., 2015; García García et al., 2016) y, en la actualidad, se encuentra fuertemente amenazado por la reducción de diversidad vegetal y el uso de agroquímicos (Aizen y Harder, 2009; Paudel et al., 2015; Neov et al., 2019).

La abeja melífera es considerada un polinizador generalista por la cantidad de recursos florísticos de los cuales obtiene su alimento, sin embargo, en su mecanismo de

pecoreo, prevalece la constancia floral. Es decir, una vez que fue establecida la asociación entre las señales sensoriales y la recompensa en una especie en particular, las abejas colectan las recompensas de sus flores durante el período de pecoreo e incluso regresan a la misma especie en vuelos sucesivos cuando la oferta es abundante. Este comportamiento está determinado por el aprendizaje y la comunicación de las señales florales recibidas con el resto de la colmena (Free, 1963; von Frisch, 1967; Farina et al., 2005). Esta actividad social también influye en la cantidad de alimento buscado y, por ende, en la cantidad de flores visitadas, ya que, a diferencia de otros insectos solitarios, el pecoreo de la abeja melífera no responde a necesidades individuales sino a las de su comunidad (Morgado et al., 2002; Muller et al., 2006; Chambó et al., 2011). Estas características, sumadas a su distribución en ambientes diversos, tolerancia a diversidad de condiciones climáticas y aptitud para el manejo humano, la hacen el insecto más eficiente para brindar servicio de polinización (Delaplane y Mayer, 2000; Michener, 2007) y el más frecuentemente utilizado en sistemas agrícolas extensivos e intensivos (Perrot et al., 2018).

La utilización de las abejas en los cultivos que requieren de polinización entomófila viene aparejada de la instalación, al inicio de la floración, de una densidad de colmenas por hectárea capaz de asegurar visitas de abejas obreras a todas las flores (James et al., 2008), incluso, utilizando una cantidad superior a la necesaria. En tal sentido, en algunos contextos, se han documentado perjuicios en los cultivos relacionados a altas densidades de abejas, seguidos de daños en las flores y exceso de polen en estigmas y estilos (Young y Young, 1992; Morris et al., 2010; Sáez et al., 2014).

Se conoce que entre el 2 % y el 10 % del tamaño total de la población de la colonia está disponible diariamente para la búsqueda de alimento (Seeley, 1985), pero este porcentaje puede variar en relación a las variables climáticas (Thom et al., 2000) y a la cantidad y calidad tanto de las reservas en la colonia como de los recursos disponibles en el paisaje circundante (Beekman et al., 2004; Odoux et al., 2014).

Por lo tanto, la densidad de colmenas recomendada dependerá de las características de la propia colonia y de otras relacionadas al lote de producción, tales como las del cultivo, la composición y abundancia de otros recursos florales que se encuentren en el lote o en cercanías del mismo, la densidad y composición de la población de polinizadores naturales, y las características climáticas. Todos estos factores pueden resultar en fuertes variaciones en la densidad de abejas pecoreando el cultivo y, en consecuencia, pueden cambiar el éxito de la polinización y la productividad del mismo. Por estas razones, la frecuencia de visitas es un parámetro más preciso para evaluar el servicio de polinización de las abejas que la densidad de colmenas por hectárea (Rollin y Garibaldi, 2018).

En tal sentido, los ensayos de visitas de insectos han sido utilizados para comprender la actividad que realizan los polinizadores, en distintas especies cultivadas (Kakutani et al., 1993; Monzón et al., 2004; Singh et al., 2006; Bauer et al., 2017).

En el girasol, estos estudios han mostrado diferencias en la actividad de los polinizadores en distintos horarios del día, lo que se relaciona con la fuente alimenticia que buscan las abejas (Free, 1964; Said et al., 2017). Mientras que algunos autores describen en híbridos una curva bimodal, con un pico en horas de la mañana y otro a primeras horas de la tarde (Free, 1964; Sammataro et al., 1984; Chambó et al., 2011; Bhowmik y Bhadra, 2015; Abbasi et al., 2021), otros autores observaron un solo pico de visitas en horas del mediodía (Ali et al., 2015; Said et al., 2017).

En Argentina, trabajando en líneas parentales androestériles, Bailez y Bedascarrasbure (1987) encontraron que el pecoreo comenzaba a las 8:00 h si bien la mayor actividad se concentraba a la tarde, con un pico máximo a últimas horas del día. Estos autores señalaron que las abejas pecoreaban a la mañana sobre las flores del día anterior y, en las últimas horas de la tarde, sobre las flores del día. Por otra parte, Andrada et al. (2004) observaron un pico de visitas a las 13 h en las líneas androestériles, mientras que en los materiales androfértiles, la frecuencia de visitas era mayor a la mañana, disminuyendo a lo largo del día.

Los estudios de comportamiento de las abejas en los lotes de girasol brindaron información muy valiosa para interpretar cómo las recompensas florales que ofrecen las plantas producen una respuesta por parte de los insectos que determina el éxito de la polinización. Estudios antiguos como los de Free (1964) y Fell (1986) documentaron, por ejemplo, que en lotes de girasol es más frecuente la colección de néctar que de polen y que puede ocurrir, bajo determinadas situaciones, que las abejas desechen el polen del cultivo durante el vuelo de regreso a la colmena. Free (1964) registró que pocas pecoreadoras hurgaron en las anteras para coleccionar polen sin libar néctar en el mismo viaje y que éstas colectoras de ambos recursos, visitaron más flores por capítulo que las que coleccionaban sólo néctar. Otra observación importante fue que las colectoras de polen presentaban menos granos en los pelos del cuerpo que las pecoreadoras de néctar, lo que se relaciona con la frecuencia de aseo que ocurre al armar la carga corbicular.

Haciendo foco en el comportamiento de pecoreo de cada recompensa por separado, Fell (1986) expuso que la colección de néctar ocurre temprano en la mañana con la secreción residual de las flores pistiladas (que pasaron por su fase estaminada el día anterior) y que luego continúa con las flores tubulares recién abiertas (estaminadas) cuando el néctar de las mismas está disponible. Este movimiento de abejas en horas de la mañana fue también mencionado por Bailez y Bedascarrasbure (1987) y explica la llegada del polen a las flores pistiladas en el momento en que los estigmas están receptivos.

Son numerosos los trabajos que relacionan diferentes características del néctar con la atractividad presentada por distintos genotipos de girasol (Mallinger y Prazifka, 2017). De hecho, resulta más aceptado el concepto de selectividad en el pecoreo del néctar que en el de polen ya que, en el primero, la abeja recibe información directa de su calidad porque lo guarda internamente, mientras que el polen es guardado externamente (Pernal y Curie, 2001). En tal sentido, se amplía la discusión sobre cómo la abeja selecciona polen de buena calidad. Algunos estudios mencionan que la elección individual estaría comandada por el aroma y la cantidad de lípidos que posee la fuente polínica (Pernal y Currie, 2002). Si bien la abeja no puede testear el nivel proteico del polen en el momento de seleccionarlo, el pecoreo de este recurso está bajo la influencia de las necesidades de la colonia, sobre todo por las de la cría, por lo cual, la naturaleza de la selección de esta recompensa operaría principalmente a nivel grupal y no individual (Pernal y Curie, 2001).

Si bien algunos trabajos relacionan la atractividad de las abejas a características de las flores tubulosas como el largo de las mismas (Mallinger y Prazifka, 2017) o el tamaño de los nectarios (Sammataro et al., 1984), los efectos de las recompensas secundarias en las especies que poseen capítulos radiados como tipo de inflorescencia, están principalmente relacionados a las flores liguladas, cuya función estaría asociada justamente a favorecer la atractividad del pseudanto a través de señales visuales (Sammataro et al., 1986). En tal sentido, varios estudios han evaluado su rol en la atractividad a través de ensayos que consisten en extraer estas flores en parte de algunos capítulos y evaluar su relación con la frecuencia de visitas y el cuajado de frutos (Stwessy et al., 1986; Neff y Simpson, 1990; Andersson, 1991; Cerca et al., 2019).

En lotes de producción de girasol híbrido, Cerrutti y Pontet (2016) encontraron una correlación positiva entre la apertura de los capítulos y exposición de estas flores y la tasa de visitas. Es decir, que a medida que los capítulos abrían, registraban mayor cantidad de visitas.

Todas estas diferencias presentadas en las recompensas primarias y secundarias y sus respuestas asociadas, han determinado que numerosos estudios, realizados tanto en *A. mellifera* como con abejas silvestres, hayan demostrado selectividad de los visitantes florales a distintos genotipos de girasol (Shein et al., 1980; Freund y Furgula 1982; Sammataro et al., 1984, 1985; Cerrutti y Pontet, 2016; Mallinger y Prazifka, 2017; Whited, 2019).

Además de la diferencia de atractividad entre distintos genotipos, se ha planteado la diferencia entre las líneas parentales que componen los sistemas de producción de semilla híbrida. Cabe recordar que para que la fecundación ocurra, las abejas deben alternar las visitas entre los capítulos androestériles y androfértiles de manera que los granos de polen adheridos a sus cuerpos lleguen al área estigmática, como es requerido.

Los rasgos morfológicos como la altura de la planta, el diámetro del capítulo y la forma y cantidad de flores liguladas, varían notablemente entre genotipos de líneas parentales, lo que podría afectar la constancia floral de la abeja melífera en estos sistemas de producción y resultar en un menor porcentaje de éstas moviéndose desde líneas macho a líneas hembras (Susic Martin y Farina, 2016). Como consecuencia, una mayor fidelidad a una línea parental puede traducirse en una menor transferencia de polen de plantas androfértiles a androestériles y así afectar negativamente el rendimiento y calidad (calibre) de la semilla lograda.

Estravis Barcala et al. (2019) observaron que, aunque la mayoría de las abejas melíferas buscaban néctar en las líneas femeninas, la mayoría de ellas tenía polen de girasol adherido en el cuerpo, lo que indica que los granos de polen finalmente son transportados por las abejas a las inflorescencias femeninas. Varios autores proponen que ese polen en los pelos de las abejas podría provenir del contacto con otros individuos en la colmena o al ingresar a la misma (Free y Williams, 1972; DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993; Degrandi-Hoffman, 1986). Al respecto, las abejas que se encuentran en la piquera serían cruciales en su rol como vectores para transferir el polen a las que salen (Lindauer 1952; Pacheco y Breed, 2008; Susic Martin y Farina, 2016).

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Registrar y cuantificar las visitas de *A. mellifera* y otros visitantes florales en capítulos de las líneas parentales estudiadas en distintos horarios del día
- Analizar el aporte de las flores liguladas a la atractividad de los capítulos a través de la frecuencia de visitas de los polinizadores
- Evaluar la atractividad de cada genotipo y su sistema de producción en función de las preferencias de *Apis mellifera*.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de la dinámica de visitas se llevaron a cabo en los lotes de producción de semilla híbrida T, CL y AO antes descriptos (Capítulo 4).

Antes de comenzar el registro, en el centro de los lotes se seleccionaron y marcaron 10 capítulos en cada genotipo en similar estado reproductivo (R5.5 - R5.8) y a 5 de ellos se les extrajeron todas las flores liguladas, con el objeto de relacionar el efecto de su presencia en la frecuencia de visitas de polinizadores (Figura 6.1).

Luego, durante tres jornadas consecutivas, se realizaron observaciones de 15 minutos en distintos horarios del día (8:30, 10:30, 12:30, 15, 17 y 19 h), contabilizando el

número de visitantes por capítulo y diferenciando entre la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) y otras especies.



Figura 6.1: Capítulos con flores liguladas (círculos blancos) y sin las mismas (círculos rojos) utilizados para el ensayo de frecuencia de visitas.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2008). Para la comparación de la frecuencia de visitas entre genotipos y tratamientos, se realizó un ANOVA doble con el factor “día” como bloque donde se evaluó el efecto del genotipo y del tratamiento “presencia o ausencia de las flores liguladas”. Se utilizó el promedio de visitas entre los distintos horarios. La comparación de medias se hizo a través del test LSD de Fisher con un nivel de significación del 0,05.

En el caso de las visitas de *Apis mellifera*, dado que se comprobó la existencia de un componente aditivo de varianza aportado por los capítulos, los mismos no pudieron ser utilizados como réplicas, sino que se promediaron para no arribar a resultados erróneos en la interpretación de las comparaciones. En el análisis de las visitas de otras especies, no fue necesario promediar los datos recogidos en los distintos capítulos.

Finalmente se analizó la aditividad de la varianza que aportó cada uno de estos factores al análisis estadístico.

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1 Dinámica diaria de visitas

Las visitas promedio por capítulo registradas en el período observado en cada horario de muestreo se observan en la Figura 6.2. En los tres ambientes, el mayor número de visitas de *A. mellifera* ocurrió en horas de la mañana (hasta el mediodía), lo que coincide con parte

de la bibliografía consultada (Free, 1964; Andrada et al., 2004). Los picos más pronunciados de pecoreo en este horario podrían asociarse directamente a la colección de polen y néctar, ya que están disponibles en esas horas tal como fue descrito en los capítulos correspondientes. En general, de las 17 a las 19 h se observa un descenso de la frecuencia de visitas en la mayoría de los materiales (Figura 6.2) lo que coincide con una disminución de la radiación solar y la temperatura (Free, 1970; Vicens y Bosch, 2000).

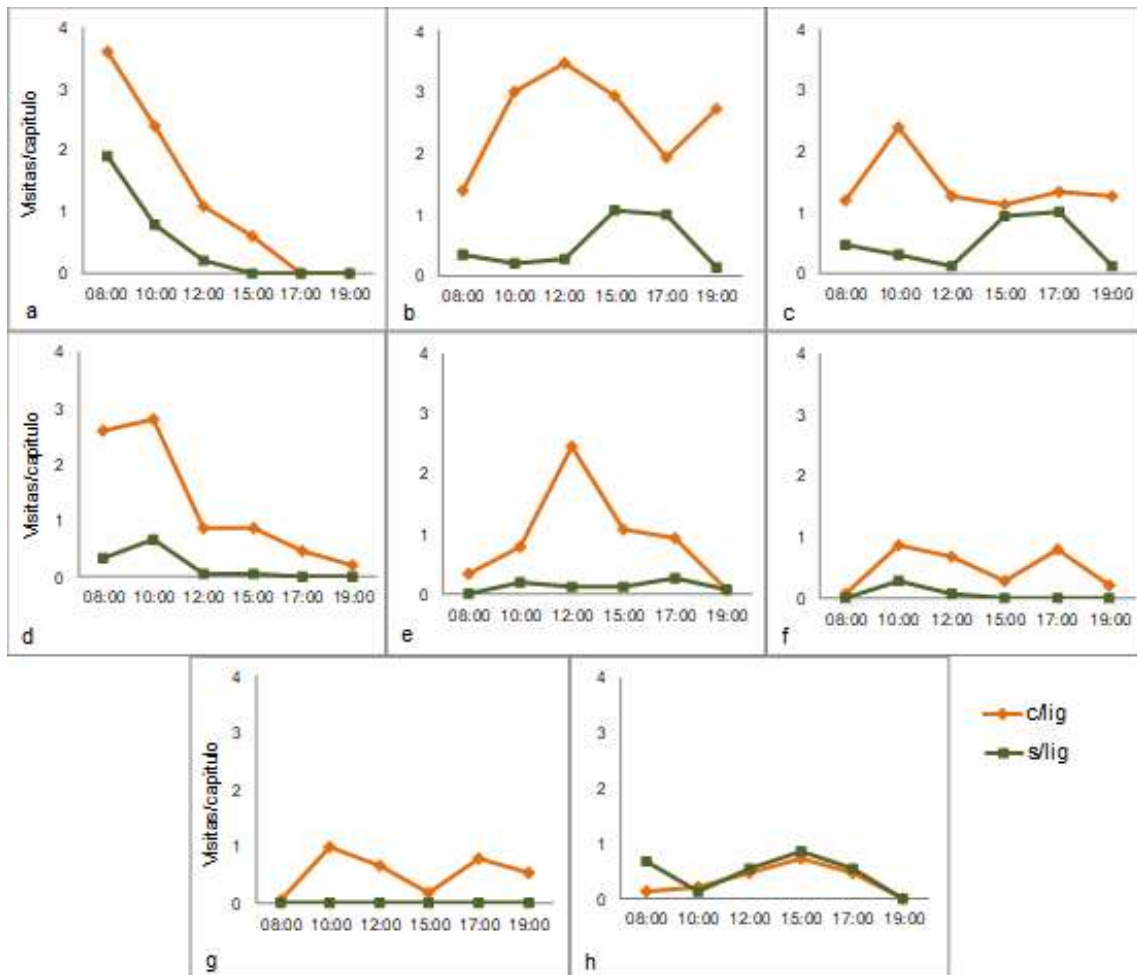


Figura 6.2: Visitas por capítulo de *Apis mellifera* L. registradas durante los 15 minutos de observación para los parentales: a) M, b) H1, c) H2, d) MCL, e) H1CL, f) H2CL, g) MAO y h) HAO en los distintos horarios de muestreo. c/lig: capítulos con flores liguladas; s/lig: capítulos sin flores liguladas.

En los parentales masculinos, principalmente en los materiales T y CL, esta preferencia de pecoreo en horas de la mañana fue aún más notoria (Figura 6.2, a y d). Este comportamiento de *A. mellifera* se corresponde con la biología de las flores del disco y el momento de liberación de polen (ver Capítulo 1). A medida que las visitas a las líneas macho disminuyeron hacia el mediodía, se registró una frecuencia creciente en las líneas femeninas (H2: pico máximo a media mañana; H1: pico máximo al mediodía).

La dinámica de visitas de *A. mellifera* a los capítulos femeninos que conservaron las flores liguladas (línea naranja) de los complejos H1 (Figura 6.2b y e) y H2 (Figura 6.2 c y f)

presentaron similitud en los picos registrados. Esto podría indicar que la dinámica de visitas en estos complejos estaría más asociada al genotipo que a la tecnología de mejoramiento que portan las líneas. Sin embargo, la curva de visitas que registraron los capítulos sin flores liguladas (línea verde), muestra una similitud en los gráficos de los materiales correspondientes al mismo lote de muestreo y tecnología.

En el lote AO, se registró una escasa cantidad de visitas en los capítulos de ambos parentales, probablemente debido a la baja condición de aislamiento del sistema de producción (Figura 4.10). Esto pudo interferir en este estudio, desviando la atención de *A. mellifera* hacia la flora competitiva (Capítulo 4). Tal como ya fuera expresado, el polen de girasol no es preponderantemente elegido por la abeja melífera cuando el cultivo se encuentra acompañado de otros recursos capaces de ofrecer recompensas con mejores niveles nutricionales (Andrada et al., 2004). Esta selección, puesta de manifiesto en un menor número de visitas, pudo observarse en el análisis de cargas corbiculares, estudio que, si bien aporta datos de sólo una de las recompensas florales ofrecidas y en una de las dos líneas parentales, brinda un análisis numérico que permite evaluar la proporción de girasol sobre otras especies.

La actividad de *A. mellifera* registrada en algunas de las líneas androestériles en horas de la tarde plantea un buen punto de partida para ampliar los estudios sobre la secreción de néctar en estos horarios, ya que es ésta la única recompensa disponible en las líneas mencionadas. En tal sentido, varios autores proponen curvas de visitas bimodales con un pico en la mañana de mayor magnitud y otro en horas de la tarde (Free, 1964; Sammataro et al., 1984; Chambó et al., 2011), lo cual coincidiría con los picos de secreción de néctar descritos por Zajác (2011) y laconis (com. pers.) en sus estudios sobre girasoles híbridos.

6.4.2 Análisis de la frecuencia de visitas entre genotipos y tratamientos

La abeja melífera fue el principal polinizador en todos los sistemas de producción estudiados, tal como muestra la Figura 6.3 en los promedios de visitas de *A. mellifera* y otras especies de insectos observados en los capítulos con y sin flores liguladas. Esto también fue observado por Torretta et al. (2010) en un estudio donde censaron las principales zonas de producción de girasol en argentina.

La diferencia de visitas de *A. mellifera* registradas entre los capítulos con y sin las flores liguladas se manifestó en el análisis estadístico en los materiales T ($F_{1,9} = 37,26$; $p = 0,0002$) y los CL ($F_{1,10} = 99,32$; $p < 0,0001$). En el caso de los materiales AO donde fue necesario particionar los genotipos por la presencia de interacción ($F_{1,6} = 8,89$; $p = 0,0246$) no se hallaron diferencias significativas de la influencia de estas flores en la HAO ($F_{1,6} = 0,60$; $p = 0,4674$) pero si en el caso del MAO ($F_{1,6} = 11,83$; $p = 0,0138$).

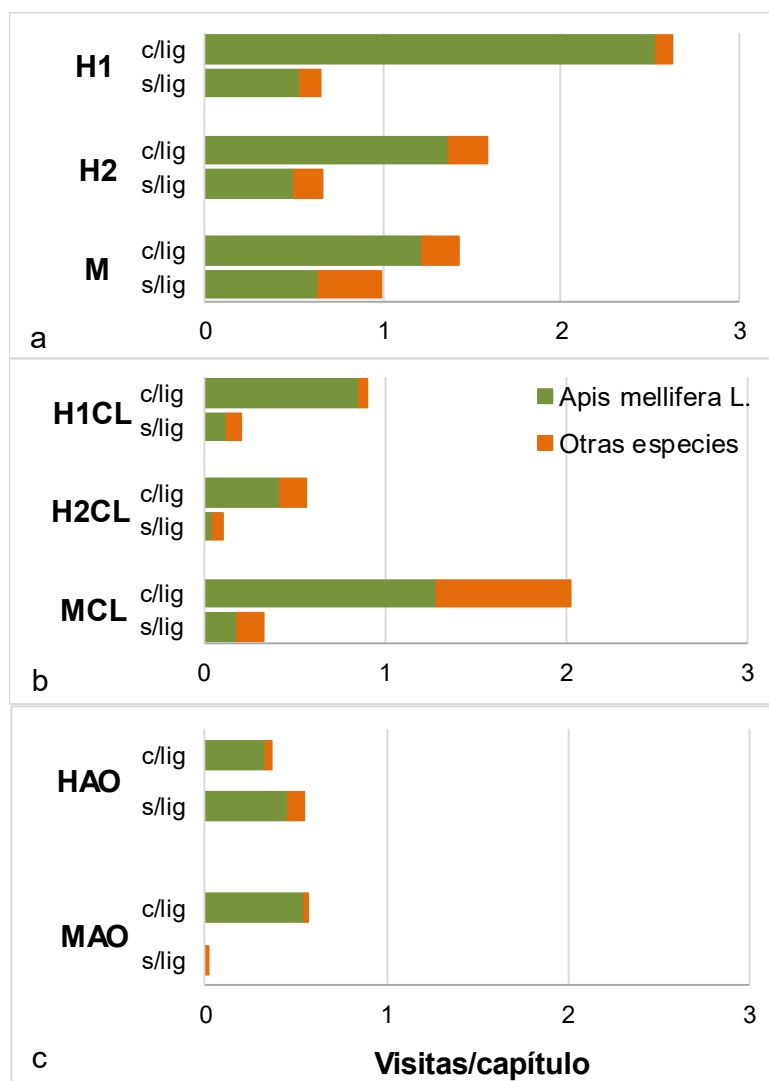


Figura 6.3: Visitas promedio por capítulo de *Apis mellifera* L. y de otras especies de visitantes para los capítulos con flores liguladas (c/lig) y aquellos que carecían de las flores mencionadas (s/lig), para los genotipos (a) Tradicionales, (b) Clearfield y (c) Alto Oleico.

En general, la frecuencia de visitas resultó significativamente mayor en los capítulos con flores liguladas respecto a los que carecían de las mismas. Las visitas cayeron entre un 48 % y un 89 % en función de la presencia de las estas flores, porcentajes que corresponden a la disminución mínima y máxima de visitas registradas entre los distintos genotipos, los cuales respondieron con distinta intensidad al tratamiento realizado.

Otros estudios exponen resultados similares en otras especies de la familia Asteráceas como los realizados en *Achillea ptarmica*, donde se observó una disminución del 51 % en la tasa de aproximación y un 12 % en la producción de semillas (Andersson, 1991). En *Helianthus grosseserratus* las visitas cayeron un 61 % en los capítulos sin flores liguladas y los rindes cayeron un 64% (Stwessy et al., 1986) mientras que en *Helianthus annuus* silvestre la disminución de las visitas se aproximó al 90 % contabilizando visitas de *Megachile* y *Bombus* (Neff y Simpson, 1990).

Respecto a la comparación de las visitas de la abeja melífera entre los capítulos de los parentales con las flores liguladas, las visitas a las H1 y H1CL fueron significativamente superiores a las de las hembras H2 y H2CL ($F_{2,9} = 7,88$; $p = 0,0105$ y $F_{2,10} = 13,48$; $p = 0,0014$, comparando materiales T y CL respectivamente; Figura 6.3 a y b). Esta menor tasa de visitas podría adjudicarse a las ya descritas características de las hembras del complejo H2 respecto a las variables morfométricas de las flores liguladas y de la secreción de néctar.

Si bien se podría esperar mayor frecuencia de visitas en los materiales androfértiles, ya que los mismos cuentan tanto con el néctar como con el polen como recompensas, en este estudio no se vio una superioridad de este tipo de parental (Figura 6.3 a y b). Sólo en el caso de los materiales CL, el macho superó a una de las hembras (H2CL) en la frecuencia de visitas ($F_{2,10} = 13,48$; $p = 0,0014$; Figura 6.3 b).

En el caso de los materiales AO, no se hallaron diferencias significativas entre los parentales en el promedio de visitas recibidas en los capítulos en presencia de las flores liguladas ($F_{1,6} = 1,80$; $p = 0,2280$; Figura 6.3 c).

Si bien en los ensayos realizados en los distintos genotipos estudiados no se obtuvieron datos referentes a la fidelidad de pecoreo dentro de las líneas parentales, las abejas no manifestaron preferencia por un tipo de sexo, lo cual, inicialmente, establecería el movimiento requerido entre líneas que permita el transporte de polen.

Respecto a las visitas de las otras especies observadas en los lotes T y CL, algunas de las cuales se ilustran en la Figura 6.4, resultaron más abundantes en los materiales androfértiles ($F_{2,82} = 4,43$; $p = 0,0149$ y $F_{2,82} = 46,51$; $p < 0,0001$, materiales T y CL, respectivamente). Esto resulta coincidente con la bibliografía consultada que cita mayor presencia de *A. mellifera* en las líneas androestériles y de otros insectos en líneas androfértiles, lo cual estaría relacionado a la colección de polen más selectiva que realiza la abeja melífera y que varía durante el año en función de la necesidad de la colmena, principalmente asociada a la cría (Tepedino y Parker; 1982; Greenleaf y Kremen, 2006; Mallinger y Prasifka, 2017).

El análisis de las diferencias entre genotipos en los capítulos sin flores liguladas podría brindar información interesante, sobre todo, en el caso de las hembras, ya que en ausencia de los atractivos visuales que brindan estas flores, las visitas estarían relacionadas sólo a la secreción del néctar por ser la única recompensa ofrecida. En tal sentido, los resultados obtenidos fueron dispares ya que si bien entre los materiales T no se hallaron diferencias en las visitas ($F_{2,9} = 0,06$; $p = 0,9428$), el parental H2CL presentó una frecuencia menor que los demás genotipos ($F_{2,10} = 13,48$; $p = 0,0014$). En el caso de los materiales AO, la hembra resultó superior en el promedio de visitas en ausencia de las lígulas ($F_{1,6} = 8,25$; $p = 0,0283$), coincidentemente con la cantidad total de néctar secretado por cada genotipo.



Figura 6.4: Otros visitantes florales encontrados junto con *Apis mellifera* en el conteo de visitas. a y b) Megachilidae (Familia)* c) Eucerini (tribu)* d) *Rachiplusia nu* e) *Eristalinus taeniops* f) *Chauliognathus scriptus*.

A través del porcentaje de aditividad de la varianza aportado por cada uno de los factores que componen el análisis de las visitas (Figura 6.5) puede verse que el factor relacionado a la presencia de las flores liguladas fue el preponderante en los primeros dos lotes de producción. Esto no pudo verse en los materiales AO, posiblemente debido al gran aporte que realiza la interacción Genotipo*Presencia liguladas que resultó significativa ($F_{1,11} = 0.89$, $p = 0.02$) y al efecto de la flora competitiva (Figura 4.10).

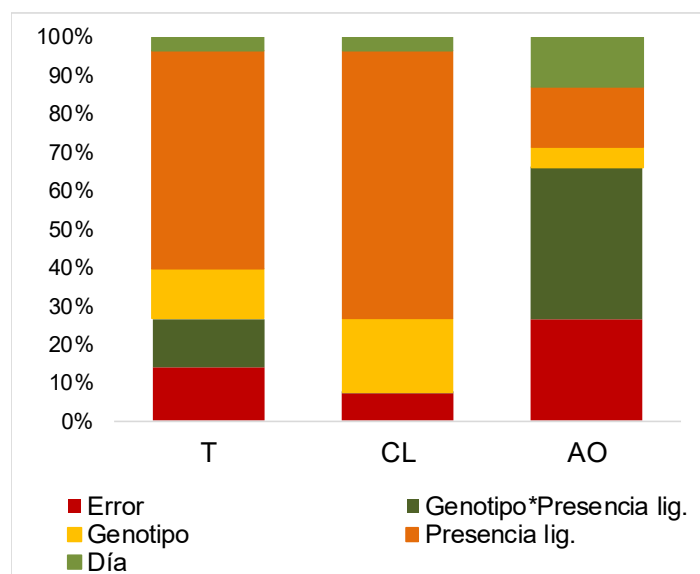


Figura 6.5: Porcentaje de aditividad a la varianza que aportan los distintos factores del análisis estadístico.

6.5 CONCLUSIONES

- *A. mellifera* fue el polinizador más abundante en los lotes estudiados y su frecuencia de visitas presentó diferencias en relación a las horas del día, siendo mayor en horas de la mañana.
- Se comprobó el efecto de las flores liguladas en la atractividad de los distintos genotipos, así como la posible interferencia de la flora competitiva.
- La frecuencia de visitas de *A. mellifera* estuvo condicionada por el genotipo resultando independiente del sexo del parental y su tecnología.

CAPÍTULO 7: ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO

7.1 INTRODUCCIÓN

La producción agrícola nacional se encuentra sustentada por una fuerte industria semillera, la que tiene un fuerte carácter federal e impacta favorablemente en las economías regionales (Szemruch et al., 2014). Esta actividad cuenta con más de 20 empresas que poseen en Argentina sus programas de mejoramiento genético y sus centros de biotecnología y producción. El 90% de estas empresas se asienta en la zona núcleo central, en el eje Pergamino-Venado Tuerto (Szemruch et al., 2014). Sin embargo, las zonas de producción de semilla de girasol se extienden desde Salta, con la producción invernal en contraestación, hasta el límite sur de la región pampeana, en el Valle Bonaerense del Rio Colorado, el que cuenta con unas 8.000 a 10.000 ha y se ha transformado en una de las zonas productoras de semilla híbrida de girasol más importantes del país (Agamennoni et al., 2011).

De las 3.000 tn de semilla de girasol que se producen en el país, casi el 100% corresponde a semilla fiscalizada, lo cual se relaciona a su procedencia híbrida (MAGyP, 2016).

El rendimiento del girasol (peso de frutos por unidad de superficie) se calcula a partir de diferentes componentes: el número de capítulos por unidad de superficie, el número de frutos llenos por capítulo y el peso individual de esos frutos. El número de capítulos por unidad de superficie depende principalmente de la densidad del cultivo (plantas por hectárea), mientras que el número de frutos llenos por capítulo es el resultado del número de flores producidas que son fecundadas, que cuajan y producen frutos (Aguirrezábal et al., 1996).

Las decisiones para el mejor aprovechamiento de los recursos genéticos y ambientales requieren de un buen conocimiento de la fisiología de la planta y de las prácticas de cultivo (Aguirrezábal et al., 1996). En el caso de la producción de semilla híbrida de girasol, su producción requiere un manejo más minucioso que la de girasol comercial y los rindes logrados son menores ya que el porcentaje de cuajado es menor (Lorenzatti, 2008). Se calcula que una hectárea de girasol para obtención de semilla híbrida produce entre la mitad y dos tercios del rendimiento por hectárea del cultivo de girasol comercial (Cobia y Zimmer, 1978). Esto se debe a la relación entre el número de líneas masculinas y femeninas en el lote de producción, la cual ya ha sido descrita en otras secciones. En este sentido, es necesario arribar a una solución de compromiso, ya que la proporción de líneas femeninas-masculinas que maximizan los rindes están relacionadas a dificultades en la movilización del polen, hecho que ha sido mencionado por algunos autores que probaron que las líneas

androestéiles que se encontraban más distantes de las androfértiles, mostraron niveles de cuajado menor (DeGrandi-Hoffman y Martin, 1993; Yadav et al., 2002).

Se ha documentado la relación directa entre el número de visitas de abejas registradas en girasoles híbridos y los rendimientos obtenidos en los mismos (Perrot et al., 2018). En líneas progenitoras, donde no existe posibilidad de autopolinización, esta relación es esencial (Oz et al., 2009).

Dentro de los factores culturales que definen la eficiencia de producción pueden mencionarse, en lo que respecta a la implantación, la época de siembra, la densidad, la uniformidad en la separación entre plantas, la profundidad de siembra y la disposición espacial del cultivo. Una de las principales condiciones que debe cumplirse para asegurar el óptimo uso de los recursos, es concretar un stand de plántulas distribuidas uniformemente a la densidad planeada. Esta condición puede lograrse con una buena preparación de la cama de siembra (humedad y densidad del suelo adecuadas), temperatura del suelo a 15°C, semilla uniforme en tamaño, de buen vigor, energía y poder germinativo y finalmente, una labor de siembra que asegure una correcta colocación de la semilla y el fertilizante (Romito et al., 2009).

En la producción de semilla híbrida, el tamaño de la semilla lograda es muy importante y el criterio de clasificación, muchas veces, depende de cada empresa. Las semillas se clasifican según su tamaño (= calibre): las grandes corresponden al grado 1 (G1), los tamaños intermedios corresponden al grado 2 (G2) y las pequeñas corresponden al grado 3 (G3). Semillas de grado 4 (G4) y las denominadas "sobrezaranda" (SZ), porque son de mayor tamaño que el G1, no son embolsadas como semilla híbrida, sino que son destinadas a la comercialización de grano, por lo tanto implican una merma del rendimiento en esta actividad (Arditti, 2014).

Teniendo en cuenta que las bolsas de semilla se completan por unidades (generalmente 180.000) y no por peso, la relevancia del calibre no sólo responde a cuestiones de embolsado y comercialización, ya que el patrón de distribución de los tamaños de las semillas de una línea endogámica cultivada en un entorno determinado influye en el número de bolsas producidas por hectárea. Por ejemplo, tamaños de semilla superiores a 4,75 mm (> G3) se comercializan en bolsas de 150.000 unidades, mientras que las semillas que miden entre 2,5 mm y 4,75 mm (G3E) se comercializan en bolsas de 250.000 unidades. Las semillas que miden menos de 2,5 mm (<G3E) no tienen valor comercial y se descartan (de Estrada et al., 2012).

Por otra parte, la desuniformidad en el tamaño de la semilla es la causa fundamental de las dificultades que presenta esta especie al ser sembrada y el principal motivo que hace que los sistemas neumáticos de las sembradoras superen ampliamente a los mecánicos (Romito et al., 2009). Al momento del establecimiento del cultivo, es importante asegurarse

la homogeneidad de las semillas, ya que las más grandes (G1 y G2) tendrán un mayor contenido de reservas que facilitarán su germinación permitiendo una mejor implantación.

Varias causas pueden explicar la brecha actual entre el rendimiento de las líneas parentales observadas en las parcelas experimentales y el rendimiento real obtenido en condiciones de campo. Entre otras, un número de plantas inferior al deseable logrado en condiciones reales; disponibilidad reducida de polen o manejo inadecuado de la polinización; y pérdidas de semillas durante los procesos de cosecha y poscosecha (de Estrada et al., 2012).

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar parámetros asociados al rendimiento en los distintos genotipos estudiados.
- Evaluar el calibre de la semilla híbrida obtenida de cada material.

7.3 MATERIALES Y MÉTODOS

En los lotes de producción de semilla híbrida descriptos, cuando los cultivos se encontraban muy cerca de alcanzar la madurez fisiológica y antes de la fecha de ingreso de las cosechadoras, (lotes T y CL: 28 de febrero del 2014 y lote AO: 12 de marzo de 2015), se cortaron 10 capítulos de cada genotipo femenino estudiado.

En gabinete se realizó la trilla manual, separación y recuento de todos los granos llenos y vanos de cada capítulo (Figura 7.1). Se registraron 2 diámetros perpendiculares de cada capítulo y se calculó el diámetro promedio. Los receptáculos fueron llevados a estufa a $52\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante y se registró el peso seco de cada uno.



Figura 7.1: Contabilización de granos llenos y vanos en los capítulos de girasol cosechados.

Para cada genotipo se determinó el peso de mil granos (P1000) y con la cantidad total de frutos llenos de cada capítulo se calculó el rendimiento por planta (Rto planta⁻¹). Este parámetro, expresado en kilos unidad de superficie (kg ha⁻¹) permitió estimar el Rinde teórico, es decir, un valor obtenido sin tener en cuenta la eficiencia de cosecha a campo relacionada con la cosechadora:

$$\text{Rinde teórico (Kg ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de capítulos}}{\text{unidad de superficie (ha)}} \times \frac{\text{Rendimiento por planta (g)}^*}{1.000}$$

$$* \text{ Rendimiento por planta (g)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ frutos llenos}}{\text{capítulo}} \times \frac{\text{Peso de mil (g)}}{1.000}$$

El número de capítulos ha⁻¹ utilizado para el cálculo fue de 65.000 plantas ha⁻¹ (Capítulo 2). Dado que en este tipo de producción no se cosecha la totalidad de las plantas sembradas, la densidad de siembra mencionada fue corregida por un factor de corrección. El mismo se calculó en función de la disposición de 10 hileras del parental androestéril intercaladas con 2 hileras del androfértil en el caso de los materiales T y CL y de 10 hileras de hembras y 3 de machos en el caso del material AO.

Para el estudio del calibre, los granos llenos de cada parental androestéril se pasaron por 4 zarandas con tamaños de orificios correspondientes a los calibres de Grado 1, 2, 3, 4 y se consideró semilla fuera de estándar a aquellas que no fueron interceptadas por ninguna de estas mallas (Figura 7.2).



Figura 7.2.: Zarandas utilizadas para determinar el calibre de los granos. De izquierda a derecha se ubican las mallas de mayor a menor diámetro de poro.

El análisis estadístico se realizó con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2008) a través de un ANOVA doble que permitió evaluar las diferencias entre genotipos (complejos H1 y H2) y el efecto de los lotes y tecnologías (T y CL). La comparación de medias se hizo a través del test LSD de Fisher con un nivel de significación del 0,05. Algunos de los parámetros registrados debieron ser transformados con la función Ln para que cumplan con los supuestos de homocedasticidad y normalidad.

Los resultados correspondientes al material AO no se incluyeron en el análisis estadístico debido a que correspondían a otro sitio y año de producción.

7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ANOVA doble realizado con los datos registrados de los capítulos cosechados en los lotes T y CL no arrojó diferencias significativas en el diámetro ($F_{1,36} = 0,001$; $p = 0,9713$ y $F_{1,36} = 0,31$; $p = 0,5841$, para la comparación entre genotipos y T/CL, respectivamente) ni en el peso seco de los receptáculos ($F_{1,36} = 0,01$; $p = 0,9265$ y $F_{1,36} = 2,93$; $p = 0,0957$, para la comparación entre genotipos y T/CL, respectivamente; Figura 7.3 a). Por su parte, si bien no fue incluido en el análisis, el material HAO presentó un diámetro y peso seco del capítulo con promedios similares o superiores a los registrados en los otros materiales (Figura 7.3 b).

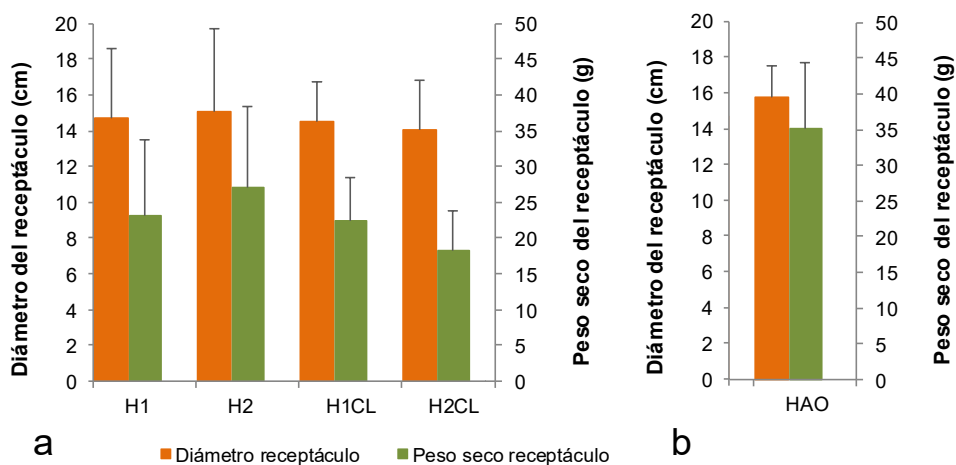


Figura 7.3: Promedios y desvíos estándar del diámetro (cm) y el peso seco (g) de los receptáculos en los materiales: a) H1, H2, H1CL y H2CL y b) en HAO.

Respecto al número de frutos totales por capítulo, no se encontraron diferencias significativas entre las hembras del complejo H1 y las del complejo H2 ($F_{1,36} = 0,0001$; $p = 0,992$, Figura 7.4 a), pero sí entre los materiales con o sin tecnología CL ($F_{1,36} = 5,38$; $p = 0,0262$, Figura 7.4 a).

Aguirrezábal et al. (1996) sostienen que el espacio disponible que ofrece el tejido del receptáculo para que nuevas flores se diferencien, es un factor determinante del número

total de flores que pueden desarrollarse y por ende del número de frutos totales. Sin embargo, en este caso, no sólo no existieron diferencias en el diámetro promedio de los capítulos sino que las condiciones de los sitios de cultivo fueron similares y los requerimientos de agua y nutrientes estuvieron cubiertos. Por ello, se podría asociar la merma en el número de frutos cuajados a la mejora tecnológica introducida e inferir que los materiales T tendrían una mayor cantidad total de frutos por capítulo que los CL.

Por su parte, el total de frutos promedio por capítulo de la HAO fue numericamente algo mayor al de los otros genotipos, pero no pudo ser comparado estadísticamente (Figura 7.4 b).

Las hembras del complejo H1 presentaron mayor proporción de frutos llenos que vanos mientras que en los materiales del complejo H2, así como en el material HAO, se observó exactamente lo contrario (Figura 7.4 a y b). Las hembras del complejo H2 tuvieron, en promedio, el 75,35 % de los granos vanos, porcentaje resultó significativamente superior ($F_{1,36} = 83,51$; $p < 0,0001$) al presentado por las hembras del complejo H1 (34,06 %). No se hallaron diferencias significativas en la comparación entre lotes/tecnologías en el porcentaje de vaneos ($F_{1,36} = 0,54$; $p = 0,467$).

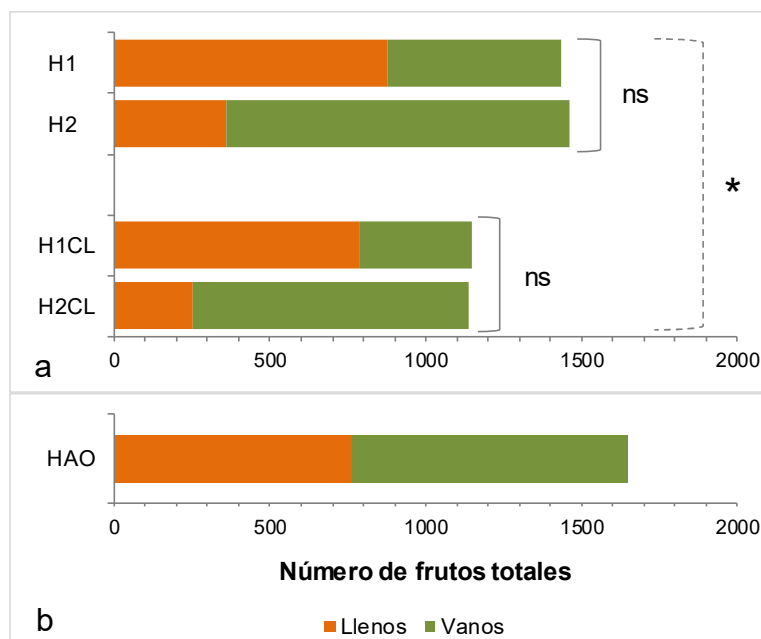


Figura 7.4: Número de frutos totales por capítulo. (a) Genotipos H1, H2, H1CL y H2CL. (b) Material HAO. Corchete de línea continúa: comparación del número de frutos totales entre genotipos que compartían lote y tecnología (H1/H2 y H1CL/H2CL). Corchete de línea discontinua: comparación entre materiales de distinto lote y tecnología (T/CL). * indica diferencias significativas entre los materiales comparados; ns indica diferencias no significativas con un nivel de $p < 0,05$.

El hecho de que no existieran diferencias asociadas al genotipo en el número de frutos totales pero si en el porcentaje de vaneos permite inferir que no hay una diferencia de rinde asociada al potencial de producción, sino a falencias de polinización o llenado de los frutos durante la fase reproductiva (Oz et al., 2009). Al descartar el último aspecto por lo antes

dicho, las notorias fallas en el cuajado en las hembras del complejo H2 confirman los resultados observados en las visitas (Capítulo 6).

Con respecto al P1000, los valores promedio fueron superiores a los mencionados en la bibliografía consultada (Oz et al., 2009; Fakirah et al., 2017 y Patil et al., 2018).

En este parámetro se halló interacción en el análisis estadístico, por lo cual, fue necesario evaluar los lotes por separado ($F_{1,36} = 3,96$; $p = 0,0542$). No se encontraron diferencias significativas entre los parentales con o sin tecnología CL en ninguno de los dos complejos (H1: $F_{1,18} = 2,79$; $p = 0,1119$ y H2: $F_{1,18} = 1,63$, $p = 0,2176$). La comparación dentro de los materiales T mostró diferencias en este parámetro, siendo la H2 la que presentó el promedio superior ($F_{1,18} = 9,8$; $p = 0,0058$) (Figura 7.5).

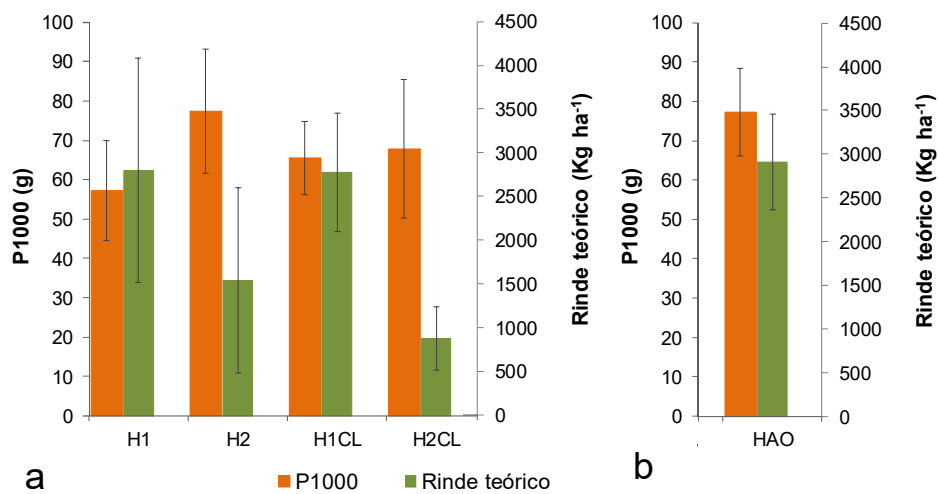


Figura 7.5: Promedios y desvíos estándar correspondientes al P1000 (Peso de mil granos, g) y Rinde teórico (kg ha⁻¹) de los materiales estudiados.

Con respecto al Rinde teórico, el factor aportado por la mejora tecnológica Clearfield no mostró diferencias significativas ($F_{1,36} = 0,08$; $p = 0,7749$), no reflejando en el rinde las diferencias observadas durante el conteo de frutos totales, donde los materiales T habían mostrado promedios superiores (Figura 7.4).

En cuanto al factor genotipo, el rinde resultó significativamente superior en las hembras del complejo H1 ($F_{1,36} = 21,58$; $p < 0,0001$). Este rinde inferior presentado por las hembras del complejo H2 puede asociarse directamente al porcentaje de vaneo y no al peso de mil, ya que en el caso de los materiales T este último parámetro fue incluso superior con respecto a la H1 aunque indiferente en el caso de los materiales CL. Este efecto compensatorio observado entre el P1000 y el Rinde teórico reflejó la distribución de los fotosimilados entre una menor cantidad de frutos y un llenado superior de los mismos, lo cual fue antes citado por otros autores para el girasol (Barros et al., 2004; Perrot et al., 2018).

Por otro lado, si bien no pudo evaluarse a través del análisis estadístico, se observó que la HAO tuvo un Rinde teórico similar al genotipo H1, dentro de los mejores obtenidos

(Figura 7.5). Si bien esto no condice con el porcentaje de vaneo que presentó (aprox. 50%), si lo hace con su alto número de semillas totales. Esto está directamente asociado a un tamaño de capítulo mayor (Perrot et al., 2018) que se observó en el diámetro y peso seco de los capítulos (Figura 7.3).

Con respecto al calibre, la mayor parte de los frutos cosechados pertenecieron a grados aptos para la comercialización (de Estrada et al., 2012) (Figura 7.64).

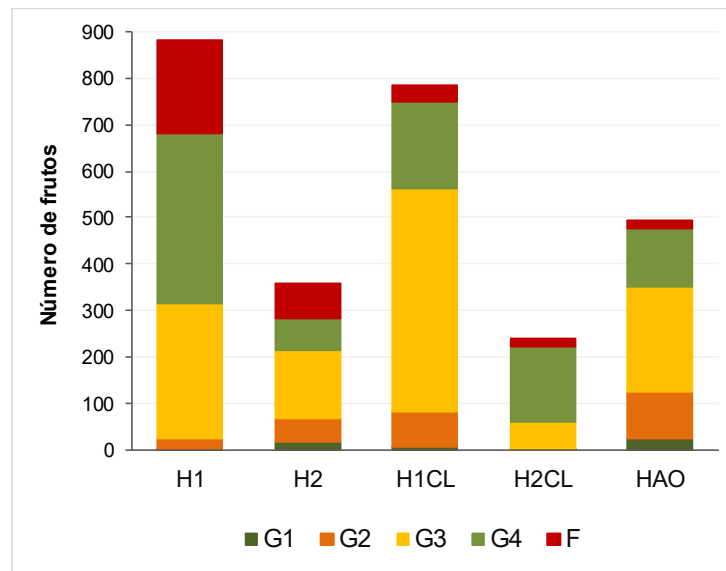


Figura 7.6: Número de frutos obtenidos en los genotipos estudiados distribuidos según su calibre. G1: grado 1, G2: grado 2, G3: grado 3, G4: grado 4 y F: fuera de zaranda.

7.5 CONCLUSIÓN

- Los materiales androestériles T y CL correspondientes a los complejos H1 y H2 presentaron diámetros similares de capítulo, sin embargo, difirieron en el número de frutos totales siendo este parámetro mayor en los materiales T.
- Para un número estadísticamente similar de frutos totales por capítulo, las hembras del complejo H1 presentaron mayor número de granos llenos.
- El alto porcentaje de vaneo de las hembras del complejo H2 se corresponde con la baja frecuencia de vistas en ellas registradas.
- El diámetro y número de frutos totales de los capítulos de la HAO da cuenta de que el potencial de semilla a producir de este genotipo era más alto que el de los demás genotipos evaluados, sin embargo, su porcentaje de llenado de grano fue escaso, lo cual podría estar relacionado a la baja frecuencia de visitas de *Apis mellifera* que registró.

CAPÍTULO 8: CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis general planteada al principio de esta tesis en cuanto a que las características de las recompensas florales cuantificadas en las líneas parentales estudiadas generaron una respuesta diferencial en las visitas de los polinizadores, principalmente *A. mellifera*, poniendo así de manifiesto las diferencias de atraktividad de los genotipos. Finalmente, la frecuencia de visitas registrada mostró una correspondencia con los rendimientos y calibres obtenidos, demostrando el beneficio económico de la polinización en un sistema de producción de semilla híbrida (Figura 8.1).

Resulta dificultoso individualizar el efecto de cada uno de los atributos medidos en las visitas observadas como para poder asociarlos de manera directa con las diferencias de atraktividad presentadas por los genotipos estudiados. En tal sentido, las recompensas, ya sean primarias o secundarias, operan en conjunto y a distintas escalas: mientras las señales visuales le indican a larga distancia a los polinizadores la existencia de néctar y/o polen, estos últimos operan a corta distancia, sobre todo el néctar que al estar en el interior del tubo de la corola es descubierta por la abeja al momento del pecoreo .

Los distintos ensayos llevados a cabo en esta tesis permitieron interpretar cuales serían las recompensas más influyentes a la hora de definir una atraktividad diferencial entre las líneas parentales. La diferencia entre las visitas registradas en los capítulos con y sin flores liguladas dejó en evidencia que estas estructuras son un componente fundamental que incide en la atraktividad de los genotipos y ello se verificó en 7 de los 8 materiales genéticos estudiados. Por su parte, la comparación entre capítulos sin flores liguladas entre parentales androestériles, es decir, que carecían de las recompensas visuales y de polen, no mostró una tendencia clara en la frecuencia de visitas que informe sobre el efecto de la secreción de néctar. Tampoco se observó una diferencia notable en las visitas entre las hembras y machos, indicando que el aporte de polen como recompensa alimenticia no sería un factor que defina la atraktividad de las líneas. En tal sentido, en el sistema de producción de semilla híbrida es fundamental que la abeja distribuya sus visitas entre ambos parentales de manera que llene su cuerpo con suficiente polen al visitar las líneas androfértiles y lo deposite en las flores de las líneas androestériles. Una diferencia de atraktividad muy marcada entre estas líneas podría generar problemas en esa distribución. Es este estudio no se observó una asimetría en la frecuencia de visitas que pueda asociarse directamente al sexo de los parentales, de hecho, el mayor contraste en las visitas registradas se observó entre las líneas hembra dentro de la comparación correspondiente.

Como ya ha sido demostrado, la morfología del polen de girasol está eficientemente adaptada a la polinización entomófila. Lograda la atracción necesaria para que la abeja se aproxime a las plantas de esta especie, las espinas de la esporodermis de los granos y el

abundante pollenkitt asegurarán una buena adhesión al cuerpo de la abeja para ser transportado. En las líneas androfértiles estudiadas, se demostró una producción abundante de polen en las flores de todo el disco (SE, SM y SI), con un polen de calidad nutricional reducida, lo que implica que los fines reproductivos son cubiertos con un bajo costo energético. Asimismo, la estabilidad hallada en la germinabilidad del polen durante las horas del día evaluadas contribuye a asegurar que este parámetro no sería un problema al cual adjudicarle disminuciones de los rendimientos.

En este contexto, se demostró que, en baja presencia de otra flora más atractiva, la abeja colecta polen de girasol como fuente alimenticia, no siendo esta recompensa la más determinante en la atractividad de los genotipos parentales de este cultivo. Es muy importante asegurar su abundancia y transporte con fines reproductivos, pero no sería protagonista en cuanto a su rol como recompensa primaria.

En la mayoría de las variables medidas (a excepción de los granos de polen por flor) las diferencias encontradas entre las comparaciones estadísticas que pudieron llevarse a cabo se dieron entre genotipos y no entre las mejoras tecnológicas con las que contaban las líneas. Sería fundamental profundizar estos estudios en otros materiales con resistencia a herbicida y mayor contenido de ácidos grasos saturados para reforzar estos conceptos.

En el mejoramiento vegetal de cultivos, los procesos de selección operan con tiempos y presiones muy distintas a las que ocurren en la selección natural, perdiendo de vista los atributos florales relacionados a la polinización. Dado que, en general, el objetivo principal de los programas de mejoramiento se centran en el rendimiento, se omiten algunas características morfológicas de las plantas que finalmente operan en contra de la relación planta-polinizador. Por ejemplo en este estudio, la morfología de las flores liguladas y el largo de los estilos de las flores tubulosas de las hembras del complejo H2 influyó directamente de manera negativa en la frecuencia y mecánica de pecoreo de las abejas, reflejándose ello en los frutos logrados.

De los parámetros estudiados en esta tesis, los más promisorios para ser tenidos en cuenta en programas de mejoramiento son las variables morfométricas de las flores y la cantidad de néctar secretado, por la estabilidad genética que mostraron. La profundización del conocimiento respecto a las recompensas florales que caracterizan a cada genotipo y la utilización de la heredabilidad de los parámetros estudiados permitiría la selección de líneas parentales con un mejor comportamiento a campo relacionado a la eficiencia de polinización, ya que frutos de un buen calibre y peso de mil no consiguen por si solos llegar al potencial de rendimiento de cosecha si los porcentajes de cuajado por fallas en la polinización operan en su contra.

El conocimiento de la incidencia de las recompensas en la atractividad de las líneas parentales también puede brindar estrategias de manejo a campo a la hora de diseñar y

mantener el sistema de producción de semilla. Esta información puede resultar muy útil para decidir la cercanía de genotipos con una marcada diferencia en la atractividad (como ocurrió en los sistemas estudiados entre las hembras del complejo H1 y las del complejo H2) y la disposición de líneas parentales en el lote (proporción de líneas macho respecto a las surcos de las hembras). Además, entender las características de la interacción especie cultivada-polinizador permite tomar mejores decisiones respecto al número de colmenas que son necesarias en cada situación y evaluar correctamente la actividad de las mismas, hecho directamente relacionado al estado que presentaron al momento de ingresar al lote y su desarrollo durante el período en que están brindando el servicio. En relación a este último punto, es importante volver a remarcar las características del polen de girasol. La baja calidad nutricional para las abejas hace necesario replantear los conceptos de flora competitiva y flora acompañante respecto a las especies en floración que se encuentren en el lote o cercanías del mismo (Figura 8.1). Un equilibrio controlado de las mismas permitiría un mejor estado general de las colmenas para sostener la sanidad y el desarrollo de la cría, potenciando el trabajo de las pecoreadoras sin generar un nivel de interferencia riesgoso respecto al cultivo de girasol.

Es muy importante tener en cuenta que el manejo agronómico de un sistema tan dependiente de la interacción mutualista que determina que la fecundación y producción de semillas ocurra, no puede ser manejado como cualquier otro monocultivo. Conocer y comprender la relación entre la biología floral del cultivo y la actividad de los polinizadores basada en sus necesidades y capacidades es fundamental para realizar un manejo más sustentable del sistema que favorezca las relaciones biológicas de los protagonistas que lo sostienen. Su éxito, sin dudas, determinará mejoras en el rendimiento y calidad de la producción.

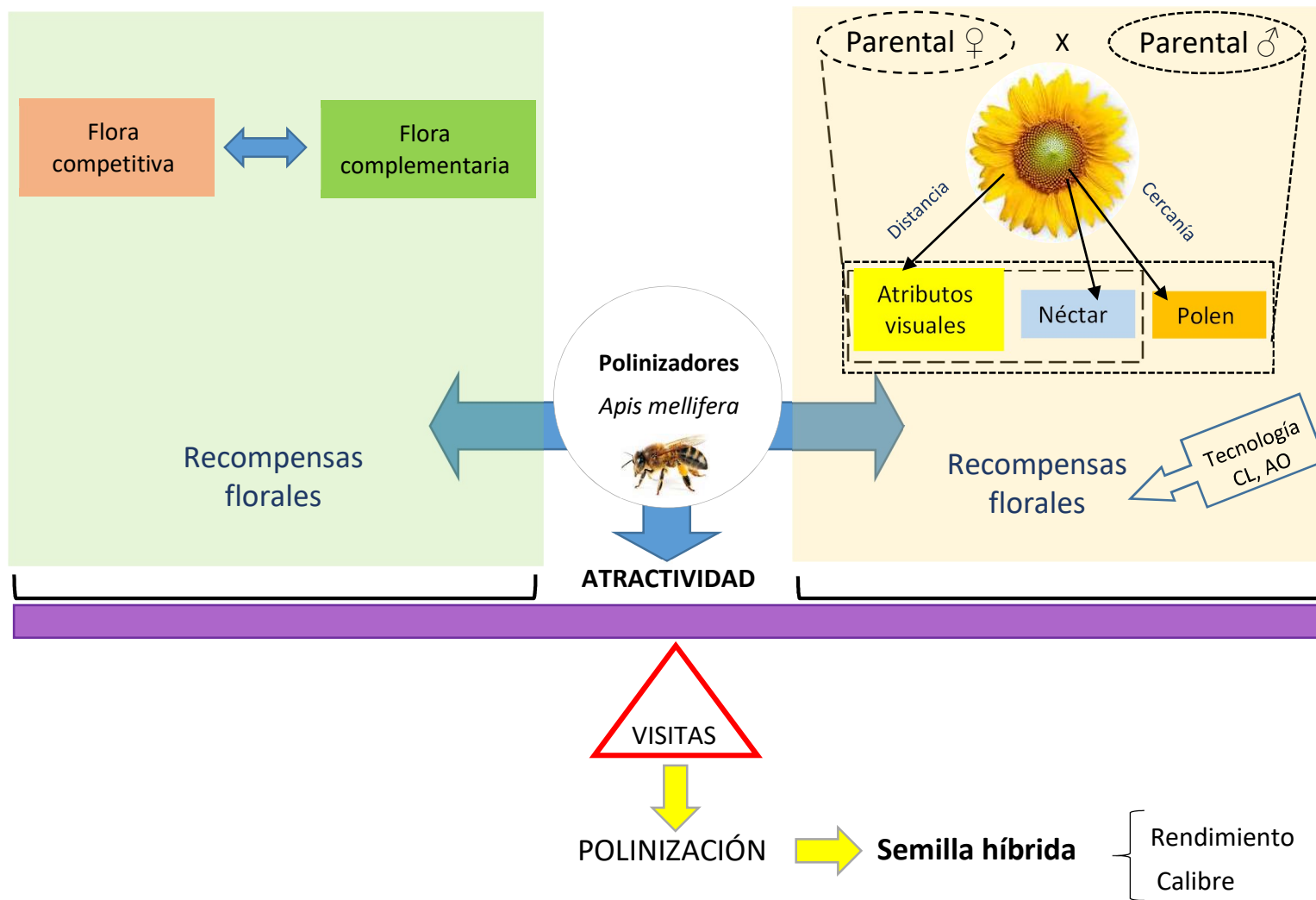


Figura 8.1: Componentes que forman parte del sistema de producción de semilla híbrida de girasol y sus interacciones.

BIBLIOGRAFÍA

- AAPRESID (Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa). 2015. Ganadería de ciclo completo sobre verdes en Tornquist. <https://www.aapresid.org.ar/blog/ganaderia-de-ciclo-completo-sobre-verdeos-en-tornquist/>
- Abbasi, K.H., Jamal, M., Ahmad, S., Ghramh, H.A., Khanum, S., Khan, K.A., Ullah, M.A., Aljedani, D.M. y Zulfiqar, B. 2021. Standardization of managed honey bee (*Apis mellifera*) hives for pollination of Sunflower (*Helianthus annuus*) crop. *Journal of King Saud University-Science*, 33(8), 101608. DOI: 10.1016/j.jksus.2021.101608
- Abrahamczyk, S., Kessler, M., Hanley, D., Karger, D.N., Müller, M.P., Knauer, A.C., Keller, F., Schwerdtfeger, M. y Humphreys, A. M. 2017. Pollinator adaptation and the evolution of floral nectar sugar composition. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(1), 112-127. DOI: 10.1111/jeb.12991
- Adgaba, N., Al-Ghamdi, A., Tadesse, Y., Getachew, A., Awad, A.M., Ansari, M.J., Owayss, A.A., Mohammed, S.E.A. y Alqarni, A.S. 2017. Nectar secretion dynamics and honey production potentials of some major honey plants in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 180-191. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.05.002
- Agamennoni R., Rivas J., Vanzolini J. I. y Matarazzo R. 2011. Cultivos alternativos semi-intensivos difundidos en el Valle Bonaerense del Rio Colorado (VBRC). EEA INTA Ascasubi
- Aguirrezábal, L.A., Orioli, G.A., Hernández, L.F., Pereyra, V.R., y Miravé, J.P. 1996. *Girasol: Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento*. INTA Unidad Integrada Balcarce. <http://www.asagir.org.ar/descargar-archivo-109/archivos-c16844dbaac3a8fde2b71fadbc48f7dd>
- Aigner, P.A. 2006. The evolution of specialized floral phenotypes in a fine-grained pollination environment. *Plant-pollinator interactions: From specialization to generalization*, 23, 46.
- Aizen, M.A. y Harder, L.D. 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, 19(11), 915-918. DOI: 10.1016/j.cub.2009.03.071
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., y Klein, A.M. 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*. 103(9), 1579-1588.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. y Le Conte, Y. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562-565. DOI: 10.1098/rsbl.2009.0986
- Alexander, M.P. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain technology*, 55(1), 13-18. DOI: 10.3109/10520298009067890
- Ali, H., Owayss, A.A., Khan, K.A. y Alqarni, A.S. 2015. Insect visitors and abundance of four species of *Apis* on Sunflower *Helianthus annuus* L. in Pakistan. *Acta Zoologica Bulgarica*, 67(2), 235-240. <http://acta-zoologica-bulgarica.eu/downloads/acta-zoologica-bulgarica/2015/67-2-235-240.pdf>
- Al-Khatib, K., Baumgartner, J.R., Peterson, D.E., y Currie, R.S. 1998. Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). *Weed Science*, 403-407. DOI: 10.2307/4046055
- Alkio, M., Diepenbrock, W. y Grimm, E. 2002. Evidence for sectorial photoassimilate supply in the capitulum of sunflower (*Helianthus annuus*). *New Phytologist*, 156(3), 445-456. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2002.00524.x
- Aloni, B., Peet, M., Pharr, M., y Karni, L. 2001. The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiologia Plantarum*, 112(4), 505-512. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1120407.x

- Amorim, F. W., Galetto, L., y Sazima, M. 2013. Beyond the pollination syndrome: nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant biology*, 15(2), 317-327. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2012.00643.x
- Anand, C., Umranikar, C., Shintre, P., Damle, A., Kale, J., Joshi, J., y Watve, M. 2007. Presence of two types of flowers with respect to nectar sugar in two gregariously flowering species. *Journal of biosciences*, 32(4), 769-774. DOI: 10.1007/s12038-007-0077-1
- Andersson, S. 1991. Floral display and pollination success in *Achillea ptarmica* (Asteraceae). *Ecography*, 14(3), 186-191. DOI: 10.1111/j.1600-0587.1991.tb00651.x
- Andersson, S. 1996. Floral display and pollination success in *Senecio jacobaea* (Asteraceae): interactive effects of head and corymb size. *American Journal of Botany*, 83(1), 71-75. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1996.tb13876.x
- Andrada, A., Valle, A., Paoloni, P. y Gallez, L. 2004. Pollen and nectar sources used by honeybee colonies pollinating sunflower (*Helianthus annuus*) in the Colorado river valley, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 39: 75-82. DOI: <https://core.ac.uk/download/pdf/153566356.pdf>
- Aquino, J. D. C., Juan, X. P., y Gaban, P. B. V. 2021. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Floral nectar characterization and gene expression analysis of sucrose hydrolyzing gene HaCWINV2. *Philippine Journal of Science*, 150(5), 1079-1087. https://philjournalsci.dost.gov.ph/images/pdf/pjs_pdf/vol150no5/sunflower_floral_characterization_and_gene_analysis_of_sucrose_.pdf
- Araméndiz-Tatis, H., Cardona-Ayala, C. y Jarma-Orozco, A. 2013. Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (*Solanum melongena* L. cv. Lila criolla). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2), 351-358. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262013000200009
- Arditti, S. 2014. Producción de semilla híbrida de girasol (*Helianthus annuus* L.) en el Valle Inferior del Río Colorado: Impacto del estado sanitario del cultivo en el rendimiento. Tesis de grado. Depto. Agronomía, UNS.
- Armaza A.C. 2013. Polen corbicular colectado por *Apis mellifera* L.: importancia del tamaño de muestra. Trabajo Final - Técnico Universitario Apícola. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.
- Astiz V. 2012. *Biología polínica, fecundación y rendimiento en dos genotipos híbridos de girasol (Helianthus annuus L.) alto oleico*. Tesis de Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Astiz, V., y Hernández, L. F. 2014. Pollen production pattern in the capitulum of the cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 83(1), 27-36.
- Atlagić, J., Joksimović, J., Sakač, Z., Miklič, V. y Dušanić, N. 2003. Mode of inheritance and heritability of disc flower corolla length and nectar content in sunflower. *Genetika*, 35(1), 59-65. DOI: 10.2298/GENSR0301059A
- Ávila, M.J. 2009. *Manual para el Cultivo de Girasol*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Serie B N° 20. Maracay, Venezuela. <https://blogtextilesyoleaginosasfagroucv.files.wordpress.com/2016/02/manual-para-el-cultivo-del-girasol.pdf>
- Bailez O.E. y Bedascarrasbure E.L. 1987. Evaluación de la preferencia de las abejas por líneas androfértiles de girasol. *Actas V Reunión Técnica Nacional de Girasol*, ASAGIR. 51-55.
- Baker, H.G. 1975. Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica*, 37-41. DOI: 10.2307/2989798
- Baker, H.G. y Baker, I. 1982. Starchy and starchless pollen in the Onagraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 748-754. DOI: 10.2307/2398994

- Baker, H.G. y Baker, I. 1983. *Chemistry of floral nectar*. Columbia University Press: New York. 126-152
- Baker, H.G., y Baker, I. 1973. Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature*, 241(5391), 543-545. DOI: 10.1038/241543b0
- Balzarini, M., Bruno, C., Córdoba, M. y Teich, I. 2015. Herramientas en el análisis estadístico multivariado. *Escuela Virtual Internacional CAVILA. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina*. https://www.researchgate.net/profile/Monica-Balzarini/publication/286931204_Herramientas_en_el_Analisis_Estadistico_Multivariado/links/5670e57808ae0d8b0cc1001a/Herramientas-en-el-Analisis-Estadistico-Multivariado.pdf
- Barros, J.F., de Carvalho, M. y Basch, G. 2004. Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to sowing date and plant density under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy*, 21(3), 347-356. DOI: 10.1016/j.eja.2003.10.005
- Barrow, J.R. 1983. Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton 1. *Crop Science*, 23(4), 734-736. DOI: 10.2135/cropsci1983.0011183X002300040031x
- Baskin, J.M., y Baskin, C.C. 2018. Pollen limitation and its effect on seed germination. *Seed Science Research*, 28(4), 253-260. DOI: 10.1017/S0960258518000272
- Bauer, A.A., Clayton, M.K. y Brunet, J. 2017. Floral traits influencing plant attractiveness to three bee species: consequences for plant reproductive success. *American journal of botany*, 104(5), 772-781. DOI: 10.3732/ajb.1600405
- Baumgartner, J.R., Al-Khatib, K., y Currie, R.S. 1999. Cross-resistance of imazethapyr-resistant common sunflower (*Helianthus annuus*) to selected imidazolinone, sulfonylurea, and triazolopyrimidine herbicides. *Weed technology*, 489-493.
- Beekman, M., Sumpter, D.J.T., Seraphides, N. y Ratnieks, F.L.W. 2004. Comparing foraging behaviour of small and large honey-bee colonies by decoding waggle dances made by foragers. *Functional Ecology*, 18, 829-835. DOI: 10.1111/j.0269-8463.2004.00924.x
- Bell, G. 1986. The evolution of empty flowers. *Journal of Theoretical Biology*, 118(3), 253-258. DOI: 10.1016/S0022-5193(86)80057-1
- Belmonte, E., Cardemil, L., y Arroyo, M.T.K. 1994. Floral nectary structure and nectar composition in *Eccremocarpus scaber* (Bignoniaceae), a hummingbird-pollinated plant of central Chile. *American Journal of Botany*, 81(4), 493-503. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1994.tb15474.x
- Bernardello, G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. In *Nectaries and néctar*. Springer, Dordrecht. 19-128. DOI: 10.1007/978-1-4020-5937-7_2
- Bertello, F. 2010. *El girasol, con un nuevo salto tecnológico*. La Nación Campo. <https://www.lanacion.com.ar/economia/campo/el-girasol-con-un-nuevo-salto-tecnologico-nid1234918/>
- Bhowmik, B. y Bhadra, K. 2015. Insect pollinators and their role on crop yield and quality of Sunflower (*Helianthus annuus*, PAC-361) from West Bengal, India. *International Journal of Current Science*, 18, 76-87. DOI: <http://www.currentsciencejournal.info/issuespdf/Kakali%20bhadra.pdf>
- Biernaskie, J.M., Cartar, R.V., y Hurly, T.A. 2002. Risk-averse inflorescence departure in hummingbirds and bumble bees: could plants benefit from variable nectar volumes?. *Oikos*, 98(1), 98-104. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2002.980110.x
- Biernaskie, J.M., y Cartar, R.V. 2004. Variation in rate of nectar production depends on floral display size: a pollinator manipulation hypothesis. *Functional Ecology*, 18(1), 125-129. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2004.00815.x
- Blaauw, B.R. y Isaacs, R. 2014. Flower plantings increase wild bee abundance and the pollination services provided to a pollination-dependent crop. *Journal of Applied Ecology*, 51(4), 890-898. DOI: 10.1111/1365-2664.12257

- Bolten, A.B., Feinsinger, P., Baker, H.G., y Baker, I. 1979. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. *Oecologia*, 41(3), 301-304. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00377434.pdf>
- Bonilla Gómez, M.A. 2012. El servicio ecosistémico de polinización prestado por las abejas En Nates-Parra, G., *Iniciativa colombiana de polinizadores – abejas - ICPA* (pp. 41-58) *Universidad Nacional de Colombia, Instituto Humboldt*. <https://promotepollinators.org/wp-content/uploads/sites/507/2019/11/abejas-polinizadoras-ebook-40217.pdf#page=42>
- Bonjour L., Grandinetti G., Tourn E., Pellegrini C., Armaza A. y Andrada A. 2013. Recompensas florales de dos genotipos androfértiles de girasol: estudio preliminar. *XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica, Boletín SAB*. 48, 100.
- Boose, D.L. 1997. Sources of variation in floral nectar production rate in *Epilobium canum* (Onagraceae): implications for natural selection. *Oecologia*, 110(4), 493-500. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s004420050185.pdf>
- Bots, M., y Mariani, C. 2005. Pollen viability in the field. *COGEM report, Radboud Universiteit Nijmegen, Netherlands*. https://library.wur.nl/WebQuery/file/cogem/cogem_i00000021_001.pdf
- Brown, W.H. 1938. The bearing of nectaries on the phylogeny of flowering plants. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 549-595.
- Burquez, A., y Corbet, S.A. 1991. Do flowers reabsorb nectar?. *Functional ecology*, 369-379. DOI: 10.2307/2389808
- Byers, D.L. 1995. Pollen quantity and quality as explanations for low seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 82(8), 1000-1006. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1995.tb11564.x
- Campbell, D.R. 1996. Evolution of floral traits in a hermaphroditic plant: field measurements of heritabilities and genetic correlations. *Evolution*, 50(4), 1442-1453. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1996.tb03918.x
- Campo, A., Ramos, M. y Zapperi, P. 2009. Análisis de las variaciones anuales de precipitación en el Suroeste bonaerense, Argentina. *XII Encuentro de Geógrafos de América Latina*. Montevideo, Uruguay. http://egal2009.easyplanners.info/area_07/7085_CampoAliciaM.pdf.
- Caramuti, V.E., Naab, O.A., Caccavari, M.A. y Hernandez, L.F. 2000. Distribución de la producción y viabilidad del polen en el capítulo de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Semiárida*, 10(2), 78.
- Carvalho, L.G., Veldtman, R., Shenkute, A.G., Tesfay, G.B., Pirk, C.W.W., Donaldson, J.S., y Nicolson, S.W. 2011. Natural and within-farmland biodiversity enhances crop productivity. *Ecology letters*, 14(3), 251-259. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2010.01579.x
- Castro, S., Silveira, P. y Navarro, L. 2009. Floral traits variation, legitimate pollination, and nectar robbing in *Polygala vayredae* (Polygalaceae). *Ecol. Res.* 24, 47-55. DOI: 10.1007/s11284-008-0481-5
- Celedón-Neghme, C., Gonzáles, W. L. y Gianoli, E. 2007. Cost and benefits of attractive floral traits in the annual species *Madia sativa* (Asteraceae). *Evolutionary Ecology*, 21(2), 247-257. DOI: 10.1007/s10682-006-9002-6
- Cerca, J., Agudo, A. B., Castro, S., Afonso, A., Alvarez, I. y Torices, R. 2019. Fitness benefits and costs of floral advertising traits: insights from rayed and rayless phenotypes of *Anacyclus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 106(2), 231-243. DOI: 10.1002/ajb2.1238
- Cerrutti, N. y Pontet, C. 2016. Differential attractiveness of sunflower cultivars to the honeybee *Apis mellifera* L. *OCL*, 23(2), 204. DOI: 10.1051/ocl/2016005
- Çetinbaş, A. y Ünal, M. 2015. Anther Ontogeny and Microsporogenesis in *Helianthus annuus* L. (Compositae). *Notulae Scientia Biologicae*, 7(1), 52-56. DOI: 10.15835/nsb719474

- Çetinbaş-Genç, A., Cai, G., Vardar, F. y Ünal, M. 2019. Differential effects of low and high temperature stress on pollen germination and tube length of hazelnut (*Corylus avellana* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 255, 61-69. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.05.024
- Chabert, S., Sénéchal, C., Fougeroux, A., Pousse, J., Richard, F., Nozières, E., Geist, O., Guillemard, V., Leylavergne, S., Malard, C., Benoist, A., Carré, G., Caumes, E., Cenier, C., Treil, A., Danflous, S., y Vaissière, B. 2020. Effect of environmental conditions and genotype on nectar secretion in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 27, 51. DOI: 10.1051/ocl/2020040
- Chalcoff, V.R., Gleiser, G., Ezcurra, C., y Aizen, M.A. 2017. Pollinator type and secondary climate are related to nectar sugar composition across the angiosperms. *Evolutionary Ecology*, 31(4), 585-602. DOI: 10.1007/s10682-017-9887-2.
- Chambó, E.D., Garcia, R.C., Oliveira, N.T.E.D. y Duarte-Júnior, J.B. 2011. Honey bee visitation to sunflower: effects on pollination and plant genotype. *Scientia Agrícola*, 68(6), 647-651. DOI: <https://www.scielo.br/pdf/sa/v68n6/v68n6a07.pdf>
- Chamer, A.M., Medan, D., Mantese, A.I. y Bartoloni, N.J. 2015. Impact of pollination on sunflower yield: is pollen amount or pollen quality what matters? *Field Crops Research*, 176, 61-70. DOI: 10.1016/j.fcr.2015.02.001
- Charnov, E.L. 1976. Optimal foraging: the marginal value theorem. *Theor. Populat. Biol.* 9(2), 129–136. DOI: 10.1016/0040-5809(76)90040-X
- Chautá-Mellizo, A., Campbell, S.A., Bonilla, M.A., Thaler, J.S., y Poveda, K. 2012. Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. *Basic and Applied Ecology*, 13(6), 524-532. DOI: 10.1016/j.baae.2012.08.013
- Chittka, L. y Raine, N.E. 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 428-435. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.05.002
- Cobia, D.W. y Zimmer D.E. 1978. *Sunflowers: production and marketing*. N. D. State University Extension Bulletin 25, 73 p.
- Conner, J. K. y Rush, S. 1996. Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia*, 105(4), 509-516. DOI: 10.1007/BF00330014
- Cook, S.M., Awmack, C.S., Murray, D.A., y Williams, I.H. 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology*, 28(5), 622-627. DOI: 10.1046/j.1365-2311.2003.00548.x
- Corbet, S.A., Willmer, P.G., Beament, J.W.L., Unwin, D.M., y Prÿs-Jones, O.E. 1979. Post-secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant, Cell & Environment*, 2(4), 293-308. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1979.tb00084.x
- Crane, E. 1990. *Bees and beekeeping: science, practice and world resources*. Heinemann Newnes.
- Cronquist, A. y Takhtadzhíāñ, A.L. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press.
- Cruden, R.W. 2000. Pollen grains: why so many?. In *Pollen and pollination*, 143-165. Springer, Vienna. DOI: 10.1007/978-3-7091-6306-1_8
- Cruden, R.W., Hermann, S.M., y Peterson, S. 1983. Patterns of nectar production and plant pollinator coevolution. En: B. Bentley y T. Elias (Eds.), *The biology of nectaries* (pp. 80–125). New York: Columbia University Press.
- Cunningham, S.A. 1995. Ecological constraints on fruit initiation by *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Arecaceae): floral herbivory, pollen availability, and visitation by pollinating bats. *American Journal of Botany*, 82(12), 1527-1536. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1995.tb13855.x
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press.

- Dafni, A., Kevan, P.G., y Husband, B.C. 2005. *Practical pollination biology*. Cambridge, Ontario: Enviroquest. 590pp.
- Davis A.R. 2001. Searching and breeding for structural features of flowers correlated with high nectar - carbohydrate production. *Acta Horticulturae*. 561, 107-121. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.561.16
- Davis, A.R. y Gunning, B.E.S. 1993. The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L. 3. Physiological aspects, including comparisons with foliar stomata. *Botanica acta*, 106(3), 241-253. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1993.tb00747.x
- Davis, A.R., y Gunning, B.E.S. 1992. The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L. 1. Development, anatomy and ultrastructure. *Protoplasma*, 166(3-4), 134-152. DOI: 10.1007/BF01322777
- de Estrada, E., Vázquez, M., Moreno, D., Bravo, S., Amores, J., San Román, G., Dodds, J., Bertero de Romano, A., Bergada, P. y Sala, C.A. 2012. Sunflower seed production: past, present, and perspectives. En *Proc. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina* (pp. 118-125). https://www.isasunflower.org/fileadmin/documents/Proceedings/18ISCvol2/6-Crop_Production_and_Management/Sunflower_seed_production._Past__present__and_perspectives_.pdf
- De la Barrera, E., y Nobel, P.S. 2004. Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in plant science*, 9(2), 65-69. DOI: 10.1016/j.tplants.2003.12.003
- Degrandi-Hoffman, G. y Chambers, M. 2006. Effects of honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging on seed set in self-fertile sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Environmental entomology*, 35(4), 1103-1108. DOI: 10.1603/0046-225X-35.4.1103
- DeGrandi-Hoffman, G. y Martin, J. H. 1993. The size and distribution of the honey bee (*Apis mellifera* L.) cross-pollinating population on male-sterile sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Apicultural Research*, 32(3-4), 135-142. DOI: 10.1080/00218839.1993.11101298
- DeGrandi-Hoffman, G. y Watkins, J.C. 2000. The foraging activity of honey bees *Apis mellifera* and non—*Apis* bees on hybrid sunflowers (*Helianthus annuus*) and its influence on cross—pollination and seed set. *Journal of Apicultural Research*, 39(1-2), 37-45. DOI: 10.1080/00218839.2000.11101019
- Degrandi-Hoffman, G., Hoopingarner, R. y Klomparens, K. 1986. Influence of honey bee (Hymenoptera: Apidae) in-hive pollen transfer on cross-pollination and fruit set in apple. *Environmental entomology*, 15(3), 723-725. DOI: 10.1093/ee/15.3.723
- Delaplane, K.S., Mayer, D.R. y Mayer, D.F. 2000. *Crop pollination by bees*. CABI Publishing, New York.
- Di Pasquale, G., Alaux, C., Le Conte, Y., Odoux, J. F., Pioz, M., Vaissière, B.E., Belzunces, L.P. y Decourtye, A. 2016. Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PloS one*, 11(9), e0162818. DOI: 10.1371/journal.pone.0162818
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C.W. 2008. InfoStat, versión 2008. *Grupo infostat, fca, universidad nacional de córdoba, argentina*, 115.
- Dilley, J.D., Wilson, P. y Mesler, M.R. 2000. The radiation of Calochortus: generalist flowers moving through a mosaic of potential pollinators. *Oikos*, 89(2), 209-222. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2000.890201.x
- Dimou, M., Thrasyvoulou, A. y Tsirakoglou, V. 2006. Efficient use of pollen traps to determine the pollen flora used by honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45(1), 42-46. DOI: 10.1080/00218839.2006.11101312
- Dreisig, H. 1989. Nectar distribution assessment by bumblebees foraging at vertical inflorescences. *Oikos*. 55, 239–249. DOI: 10.2307/3565428
- Durkee, L.T., Gaal, D.J., y Reisner, W.H. 1981. The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. I. The floral nectary. *American Journal of Botany*, 68(4), 453-462. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1981.tb07789.x

- Erdtman, G. 1966. Sporoderm morphology and morphogenesis. A collocation of data and suppositions. *Grana*, 6(3), 317-323.
- Erdtman, G. 1960. The acetolysis method, a revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*. 54: 561-564.
- Estravis Barcala, M.C., Palottini, F. y Farina, W.M. 2019. Honey bee and native solitary bee foraging behavior in a crop with dimorphic parental lines. *PLoS one*, 14(10), e0223865. DOI: 10.1093/jxb/erz532
- Evans, D.E., Rothnie, N.E., Palmer, M.V., Burke, D.G., Sang, J.P., Knox, R.B., Williams, E.G., Hilliard, E.P. y Salisbury, P.A. 1987. Comparative analysis of fatty acids in pollen and seed of rapeseed. *Phytochemistry*, 26(7), 1895-1897. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)81723-9
- Faegri, K. y Van Der Pijl, L. 1979 *Principles of pollination ecology*. Tercera edición. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. 244 pp.
- Fahn A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*. 108: 229–257. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1469-8137.1988.tb04159.x>
- Fahn, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press.
- Fakirah, A.B., Al-Thobhani, M.A. y Al-Aqil, M.M. 2017. Effect of plant density and bio-fertilizer on some morphological traits, seed yield and yield components of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*. 2, 139-155. https://acikerisim.uludag.edu.tr/bitstream/11452/5973/1/31_2_12.pdf
- Farina, W.M., Grüter, C. y Díaz, P.C. 2005. Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1575), 1923-1928. DOI: 10.1098/rspb.2005.3172
- Fell, R.D. 1986. Foraging behaviors of *Apis mellifera* L. and *Bombus* spp. on oilseed sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 72-81.
- Ferreira, K., Torres, G.A., Carvalho, I.V.D. y Davide, L.C. 2009. Abnormal meiotic behavior in three species of *Crotalaria*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(12), 1641-1646. DOI: 10.1590/S0100-204X2009001200012
- Ferrelli, F. 2016. Análisis del clima local y micro-local de la ciudad de Bahía Blanca. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Ferrerres, F., Andrade, P., Gil, M.I., y Tomás-Barberán, F.A. 1996. Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202(1), 40-44. DOI: 10.1007/BF01229682
- Fewell, J.H. y Winston, M.L. 1992. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30(6), 387-393. DOI: 10.1007/BF00176173
- Fisogni, A., Cristofolini, G., Rossi, M., y Galloni, M. 2011. Pollinator directionality as a response to nectar gradient: promoting outcrossing while avoiding geitonogamy. *Plant Biology*, 13(6), 848-856. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2011.00453.x
- Franchi, G.G., Bellani, L., Nepi, M. y Pacini, E. 1996. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora*, 191(2), 143-159. DOI: 10.1016/S0367-2530(17)30706-5
- Franco, D. 2013. *Aceites de girasol diferenciados*. Área de Sectores Alimentarios - Dirección de Agroalimentos - Subsecretaría de Agregado de Valor y Nuevas Tecnologías. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Aceites%20y%20Oleaginosas/productos/Girasol/2013/09Sep_06_girasol_diferenciados.pdf
- Free, J.B. 1963. The flower constancy of honeybees. *The Journal of Animal Ecology*, 32(1), 119-131. DOI: 10.2307/2521

- Free, J.B. 1964. The behaviour of honeybees on sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Applied Ecology*, 19-27. DOI: 10.2307/2401586
- Free, J.B. 1970. Insect pollination of crops. *Insect pollination of crops*. London, Academic.
- Free, J.B. y Williams, I.H. 1972. The transport of pollen on the body hairs of honeybees (*Apis mellifera* L.) and bumblebees (*Bombus* spp. L.). *Journal of applied Ecology*, 609-615. DOI: 10.2307/2402458
- Frei, E. 1955. *Die innervierung der floralen Nektarien dikotyler Pflanzenfamilien*. Doctoral dissertation, ETH Zurich. DOI: 10.3929/ethz-a-000089795
- Freund, D.E. y Furgula D.E. 1982. Effect of pollination by insects on the seed set and yield of ten oilseed sunflower cultivars. *American Bee Journal* 122,648-652
- Frey-Wyssling, A. 1955. The phloem supply to the nectaries. *Acta Botanica Neerlandica*, 4(3), 358-369. <http://natuurtijdschriften.nl/record/539016>
- Fründ, J., Dormann, C. F., Holzschuh, A., y Tscharrntke, T. 2013. Bee diversity effects on pollination depend on functional complementarity and niche shifts. *Ecology*, 94(9), 2042-2054. DOI: 10.1890/12-1620.1
- Gaffal, K. P., Heimler, W., y El-Gammal, S. 1998. The floral nectary of *Digitalis purpurea* L., structure and nectar secretion. *Annals of Botany*, 81(2), 251-262. DOI: 10.1006/anbo.1997.0546
- Galetto, L. 1995. Nectary structure and nectar characteristics in some Bignoniaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 196(1-2), 99-121. DOI: 10.1007/BF00985338
- Galetto, L. y Bernardello, G. 2004. Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of botany*, 94(2), 269-280. DOI: 10.1093/aob/mch137
- Galetto, L., Bernardello, G., y Sosa, C.A. 1998. The relationship between floral nectar composition and visitors in *Lycium* (Solanaceae) from Argentina and Chile: what does it reflect?. *Flora*, 193(3), 303-314. DOI: 10.1016/S0367-2530(17)30851-4
- Galetto, L., Bernardello, L.M., y Juliani, H.R. 1994. Characteristics of secretion of nectar in *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers (Bignoniaceae). *New Phytologist*, 127(3), 465-471. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb03964.x
- Galetto, L., y Bernardello, L. 1992. Nectar secretion pattern and removal effects in six Argentinean Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Botanica Acta*, 105(4), 292-299. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00301.x
- García García, M., Ríos Osorio, L. A. y Álvarez del Castillo, J. 2016. La polinización en los sistemas de producción agrícola: revisión sistemática de la literatura. *Idesia (Arica)*, 34(3), 53-68. DOI: 10.4067/S0718-34292016000300008
- Garibaldi, L.A., Carvalheiro, L.G., Leonhardt, S.D., Aizen, M.A., Blaauw, B.R., Isaacs, R., Kuhlmann, M., Kleijn, D., Klein, A.M., Kremen, C., Morandin, L., Scheper, J. y Winfree, R. 2014. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(8), 439-447. DOI: 10.1890/130330
- Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Kremen, C., Morales, J.M., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Carvalheiro, L.G., Chacoff, N.P., Dudenhofer, J.H., Greenleaf, S.S., Holzschuh, A., Isaacs, R., Krewenka, K., Mandelik, Y., Mayfield, M.M., Morandin, L.A., Potts, S. G., Ricketts, T.H., Szentgyorgyi, H., Viana, B.F., Westphal, C., Winfree, R. y Klein, A.M. 2011. Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. *Ecology Letters*. 14,1062-1072
- Ghazoul, J. 2005. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(7), 367-373. DOI: 10.1016/j.tree.2005.04.026

- Ghosh, S., Jeon, H. y Jung, C. 2020. Foraging behaviour and preference of pollen sources by honey bee (*Apis mellifera*) relative to protein contents. *Journal of Ecology and Environment*, 44(1), 1-7. DOI: 10.1186/s41610-020-0149-9
- Giannini, T.C., Boff, S., Cordeiro, G.D., Cartolano, E.A., Veiga, A.K., Imperatriz-Fonseca, V.L. y Saraiva, A.M. 2015. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46(2), 209-223. DOI: 10.1007/s13592-014-0316-z
- Gil, V. y Campo de Ferreras, A. 2000. Cuenca del arroyo del Oro: Características hidrográficas y los efectos sobre la población. *Actas III Jornadas de Geografía Física*, pp.153-159.
- Gilbert, F.S., Haines, N., y Dickson, K. 1991. Empty Flowers. *Functional Ecology*, 5(1), 29–39. DOI: 10.2307/2389553
- Godini, A. 1981. Counting pollen grains of some almond cultivars by means of an haemocytometer. *Rivista di Ortoflorofruitticoltura Italiana*, 65(3), 173-178.
- Gómez, J.M. 2002. Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. *Revista chilena de historia natural*, 75(1), 105-115. DOI: 10.4067/S0716-078X2002000100010
- Gómez, J.M., Perfectti, F., Abdelaziz, M., Lorite, J., Muñoz-Pajares, A.J. y Valverde, J. 2015. Evolution of pollination niches in a generalist plant clade. *New Phytologist*, 205(1), 440-453. DOI: 10.1111/nph.13016
- Gonzalez Andújar J.L. y Fernández Cancio A. 1985. Ecología de la alimentación en *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apoidea): Teoría de la mínima incertidumbre. *Actas do II Congreso Ibérico de Entomología*, 409-422.
- Gotelli, M.M., Galati, B.G. y Medan, D. 2010. Structure of the stigma and style in sunflower (*Helianthus annuus* L.). <http://www.scielo.org.ar/pdf/biocell/v34n3/v34n3a05.pdf>
- Graham, J.M. 1992 The hive and the honeybee. *Dadant & Sons*; Hamilton, Illinois, USA;1324 pp (revised edition).
- Greenleaf, S.S. y Kremen, C. 2006. Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13890-13895. DOI: 10.1073/pnas.0600929103
- Griebel, C., y Hess, G. 1940. The vitamin C content of flower nectar of certain Labiatae. *Zeit Untersuch Lebensmitt*, 79, 168-171.
- Güçlü, S.F. y Koyuncu, F. 2017. Effects of relative humidity on in vitro pollen germination and tube growth in sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Sci Papers Ser B Hortic*, 61, 15-20. <http://horticulturejournal.usamv.ro/pdf/2017/Art2.pdf>
- Gulyás, S. y Pesti, J. 1966. Angaben zur Anatomie der Nektarien der Centaureae. *Acta Biol. Szeged*, 12(1-2), 17-25.
- Harder, L.D. y Johnson, S.D. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist*, 183(3), 530-545. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02914.x
- Harder, L.D., y Barrett, S.C. 1995. Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature*, 373(6514), 512-515. DOI: 10.1038/373512a0
- Harder, L.D., y Cruzan, M.B. 1990. An evaluation of the physiological and evolutionary influences of inflorescence size and flower depth on nectar production. *Functional Ecology*, 559-572. DOI: 10.2307/2389323
- Hargreaves, A.L., Harder, L.D. y Johnson, S.D. 2009. Consumptive emasculation: the ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2009;84(2):259-276. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2008.00074.x

- Haucke A. 2009. *Producción de semilla de girasol (Helianthus annuus)*. Tesis de grado Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur.
- Hauser, E.J. y Morrison, J.H. 1964. The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. *American Journal of Botany*, 51(7), 748-752. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1964.tb06696.x
- Hebbar, K.B., Rose, H.M., Nair, A.R., Kannan, S., Niral, V., Arivalagan, M., Alka Gupta, Samsudeena K., Chandrana K.P., Chowdappa P. y Prasad, P.V. 2018. Differences in in vitro pollen germination and pollen tube growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars in response to high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 153, 35-44. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2018.04.014
- Heil, M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science*, 16(4), 191-200. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.01.003
- Heinrich, B. 1979. *Bumblebee economics* Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Heslop-Harrison, J. 1971. The pollen wall: structure and development. En *Pollen* (pp. 75-98). Butterworth-Heinemann. DOI: 10.1016/B978-0-408-70149-5.50013-0
- Heslop-Harrison, J. 1987. Pollen germination and pollen-tube growth. En *International Review of Cytology*, 107, 1-78. Academic Press. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61072-4
- Heyneman, A.J. 1983. Optimal sugar concentrations of floral nectars—dependence on sugar intake efficiency and foraging costs. *Oecologia*, 60(2), 198-213. DOI: 10.1007/BF00379522
- Hidalgo, M.I., Recio, M., y Cabezudo, B. 1996. Producción de polen en un matorral del Sur de España. *Acta Botánica Malacitana*, (21), 49-55. DOI: Dialnet-ProduccionDePolenEnUnMatorralDelSurDeEspana-66594%20(2).pdf
- Hinata. K. y Konno. N. 1975. Number of pollen grains in *Brassica* and allied genera. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 26, 117-124.
- Hodges, S.A. 1995. The influence of nectar production on hawkmoth behavior, self pollination, and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, 82(2), 197-204. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1995.tb11488.x
- Hoehn, P., Tschartke, T., Tylianakis, J. M., y Steffan-Dewenter, I. 2008. Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1648), 2283-2291. DOI: 10.1098/rspb.2008.0405
- Ingaramo J. y Feoli C. 2008. La importancia del complejo girasol en la Argentina. En: *El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana* (pp. 1-12). Publicación técnica N° 72. EEA INTA Anguil.
- Ion, V., Ion, N., Stefan, V., Fota, G. y Coman, R. 2008. Influence of the climatic factors on the melliferous characteristics of the sunflower hybrids. *Scientific Conference: Durable agriculture in the context of environmental changes*. Iași University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture. 51.
- Ion, N., Stefan, V., Ion, V., Fota, V. y Coman, R. 2007. Results concerning the melliferous characteristics of the sunflower hybrids cultivated in Romania. *Scient. Papers An. Sci. Biotech.* 40(2), 80-90. DOI: <https://www.usab-tm.ro/fileadmin/fzb/volum%202007/volumul%202/Apiicultura/IonN2.pdf>
- Issarakraisila, M. y Considine, J.A. 1994. Effects of temperature on pollen viability in mango cv.'Kensington'. *Annals of Botany*, 73(3), 231-240. DOI: 10.1006/anbo.1994.1028
- Jackson, S., y Nicolson, S.W. 2002. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(4), 613-620. DOI: 10.1016/S1096-4959(02)00028-3
- James, R., James, R.R. y Pitts-Singer, T.L. 2008. *Bee pollination in agricultural ecosystems*. Oxford University Press on Demand.

- Johnson, S.D. y Steiner, K.E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(4), 140-143. DOI: 10.1016/S0169-5347(99)01811-X
- Joksimović, J., Atlagić, J., Sakač, Z., Miklič, V. y Dušanić, N. 2003. Phenotypic and genotypic variability of disc flower corolla length and nectar content in sunflower. *Genetika-Belgrade*, 35(2), 131-138. DOI: 10.2298/GENSR0302131J
- Kacelnik, A., y Bateson, M. 1996. Risky theories—the effects of variance on foraging decisions. *American Zoologist*, 36(4), 402-434. DOI: 10.1093/icb/36.4.402
- Kakutani, T., Inoue, T., Tezuka, T. y Maeta, Y. 1993. Pollination of strawberry by the stingless bee, *Trigona minangkabau*, and the honey bee, *Apis mellifera*: an experimental study of fertilization efficiency. *Researches on Population Ecology*, 35(1), 95-111. DOI: 10.1007/BF02515648
- Kalyar T. 2013. Evaluation and development of breeding populations for heat resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). PhD Thesis, Sargodha, University of Sargodha.
- Kalyar, T., Rauf, S., Teixeira Da Silva, J.A. y Shahzad, M. 2014. Handling sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations under heat stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(5), 655-672. DOI: 10.1080/03650340.2013.799276
- Kessler, D., Bhattacharya, S., Diezel, C., Rothe, E., Gase, K., Schöttner, M., y Baldwin, I. T. 2012. Unpredictability of nectar nicotine promotes outcrossing by hummingbirds in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal*, 71(4), 529-538. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05008.x
- Kim, W., Gilet, T., y Bush, J.W. 2011). Optimal concentrations in nectar feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), 16618-16621. DOI: 10.1073/pnas.1108642108
- Kinman, M.L. 1970. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. En *Proceedings of the 4th International Sunflower Conference* (pp. 181-183). Paris: International Sunflower Association
- Klatt, B.K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., y Tschardt, T. 2014. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775), 20132440. DOI: 10.1098/rspb.2013.2440
- Kleinschmidt, G.J. y Kondos, A.C. 1978. Effect of dietary protein on colony performance. *Australasian beekeeper*. 80, 251-257.
- Klinkhamer, P.G., de Jong, T.J., y Metz, J.A. 1994. Why plants can be too attractive--A discussion of measures to estimate male fitness. *Journal of Ecology*, 191-194. DOI: 10.2307/2261399
- Klinkhamer, P. G., y de Jong, T.J. 1990. Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos*, 399-405. DOI: 10.2307/3565970
- Klinkhamer, P.G., y de Jong, T.J. 1993. Attractiveness to pollinators: a plant's dilemma. *Oikos*, 180-184. DOI: 10.2307/3545212
- Knauer, A.C. y Schiestl, F.P. 2015. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. *Ecology letters*, 18(2), 135-143. DOI: 10.1111/ele.12386
- Kram, B.W., Bainbridge, E.A., Perera, M.A.D.N., y Carter, C. 2008. Identification, cloning and characterization of a GDSL lipase secreted into the nectar of *Jacaranda mimosifolia*. *Plant Molecular Biology*, 68(1), 173-183. DOI: 10.1007/s11103-008-9361-1
- Kram, B.W., Xu, W.W., y Carter, C.J. 2009. Uncovering the *Arabidopsis thaliana* nectary transcriptome: investigation of differential gene expression in floral nectariferous tissues. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-16. DOI: 10.1186/1471-2229-9-92
- Kremen, C., Williams, N.M., Aizen, M.A., Gemmill-Herren, B., LeBuhn, G., Minckley, R., Packer, L., Potts, S.G., Roulston, T., Steffan-Dewenter, I., Vazquez, P., Winfree, R., Adams, L., Crone, E.E.,

- Greenleaf, S.S., Keitt, T.H., Klein, A.M., Regetz, J. y Ricketts, T.H. 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters*, 10(4), 299-314. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01018.x
- Kronstedt, E., y Walles, B. 1986. Anatomy of the *Strelitzia reginae* flower (Strelitziaceae). *Nordic Journal of Botany*, 6(3), 307-320. DOI: 10.1111/j.1756-1051.1986.tb00884.x
- Krudnak, A., Wonprasaid, S. y Machikowa, T. 2013. Boron affects pollen viability and seed set in sunflowers. *African Journal of Agricultural Research*, 8(2), 162-166. DOI: 10.5897/AJAR12.1471
- Lau, P., Bryant, V., Ellis, J.D., Huang, Z.Y., Sullivan, J., Schmehl, D.R., Cabrera, A.R. y Rangel, J. 2019. Seasonal variation of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera*) in developed areas across four regions in the United States. *PLoS One*, 14(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0217294
- Leclercq, P. 1969. Une sterilité male cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amel. Plantes*, 19, 99-106.
- Leiss, K.A., y Klinkhamer, P.G.L. 2005. Spatial distribution of nectar production in a natural *Echium vulgare* population: implications for pollinator behaviour. *Basic and Applied Ecology*, 6(4), 317-324. DOI: 10.1016/j.baae.2005.02.006
- Lin, H., Gomez, I. y Meredith, J.C. 2013. Pollenkitt wetting mechanism enables species-specific tunable pollen adhesion. *Langmuir*, 29(9), 3012-3023. DOI: 10.1021/la305144z
- Lindauer, M. 1952. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 34(4), 299-345. DOI: 10.1007/BF00298048
- Lipp, J. 1990. Detection and origin of abscisic acid and proline in honey. *Apidologie*, 21(3), 249-259. DOI: 1.1051/apido:19900310
- Lorenzatti M. 2008. *Incidencia del aumento de la densidad de siembra en la producción de semilla híbrida de girasol*. Tesis de grado. Dpto. Agronomía, UNS, Bahía Blanca.
- Louveaux, J. 1958. Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifera* L.). En *Annales de l'Abeille*. EDP Sciences.1(4), 197-221.
- Louveaux, J. 1968. Étude expérimentale de la récolte du pollen. *Traité de biologie de l'abeille*, Masson et Cie, Paris, 3, 174-203.
- Louveaux, J., Maurizio, A. y Vorwohl, G. 1978. Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59(4), 139-157. DOI: 10.1080/0005772X.1978.11097714
- Lunau, K., Piorek, V., Krohn, O. y Pacini, E. 2015. Just spines—mechanical defense of malvaceous pollen against collection by corbiculate bees. *Apidologie*, 46(2), 144-149. DOI: 10.1007/s13592-014-0310-5
- Maêda, J.M. 1985. Manual para uso da câmara de Newbauer para contagem de pólen em espécies florestais. *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro.
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2016. *Mercado de semillas para la siembra de granos en Argentina*. https://magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/granos/Informe%20Semillas_Agosto%202016.pdf
- MAGyP. (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2021. *Estimaciones agrícolas*. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
- Maldonado, S., y Otegui, M. 1997. Secretory tissues of the flower of *Sanango racemosum* (Gesneriaceae). I. Light microscopy. *Acta Botanica Neerlandica*, 46(4), 413-420. DOI: 10.1111/plb.1997.46.4.413
- Mallinger, R.E. y Prasifka, J.R. 2017. Bee visitation rates to cultivated sunflowers increase with the amount and accessibility of nectar sugars. *Journal of Applied Entomology*, 141(7), 561-573. DOI: 10.1111/jen.12375

- Mallinger, R.E., y Gratton, C. 2015. Species richness of wild bees, but not the use of managed honeybees, increases fruit set of a pollinator-dependent crop. *Journal of Applied Ecology*, 52(2), 323-330. DOI: 10.1111/1365-2664.12377
- Mani, M.S. y Saravanan, J.M. 1999. Pollination ecology and evolution in Compositae (Asteraceae). Enfield, NH: Science Publishers.
- Manning, R. 2001. Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee world*, 82(2), 60-75. DOI: 10.1080/0005772X.2001.11099504
- Martin, C.S. y Farina, W.M. 2016. Honeybee floral constancy and pollination efficiency in sunflower (*Helianthus annuus*) crops for hybrid seed production. *Apidologie*, 47(2), 161-170. DOI: 10.1007/s13592-015-0384-8
- Matteo, F. 2014. El aceite de girasol alto oleico: una speciality con potencia de negocio. *Informativo semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario, AÑO XXXII - N° 1670*. <https://file:///C:/Users/Gisela/Google%20Drive/becca%20cic/Seleccionado/Girasol%20general/girasol%20AO.pdf>
- McCarthy, E.W., Chase, M.W., Knapp, S., Litt, A., Leitch, A.R., y Le Comber, S.C. 2016. Transgressive phenotypes and generalist pollination in the floral evolution of *Nicotiana* polyploids. *Nature Plants*, 2(9), 1-9. DOI: 10.1038/nplants.2016.119
- McGregor, S.E. 1976. *Insect pollination of cultivated crop plants* (Vol. 496). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press. 953 p.
- Miklić, V., Sakač, Z., Dušanić, N., Atlagić, J., Joksimović, J. y Vasić, D. 2004. Effects of genotype, growing conditions, and several parameters of sunflower attractiveness for bee visitation. *In Proc. of the 16th International Sunflower Conference* (pp. 871-876). [https://www.researchgate.net/profile/Dragana-Miladinovic/publication/281092440_EFFECTS_OF_GENOTYPE_GROWING_CONDITIONS_AND_SEVERAL_PARAMETERS_OF_SUNFLOWER_ATTRACTIVENESS_FOR_BEE_VISITATION/links/55d4686d08ae0a3417234663/EFFECTS-OF-GENOTYPE-GROWING-CONDITIONS-AND-SEVERAL-PARAMETERS-OF-SUNFLOWER_ATTRACTIVENESS_FOR_BEE_VISITATION.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Dragana-Miladinovic/publication/281092440_EFFECTS_OF_GENOTYPE_GROWING_CONDITIONS_AND_SEVERAL_PARAMETERS_OF_SUNFLOWER_ATTRACTIVENESS_FOR_BEE_VISITATION/links/55d4686d08ae0a3417234663/EFFECTS-OF-GENOTYPE-GROWING-CONDITIONS-AND-SEVERAL-PARAMETERS-OF-SUNFLOWER-ATTRACTIVENESS-FOR-BEE-VISITATION.pdf)
- Milne Jr, C.P., Hellmich, R.L. y Pries, K.J. 1986. Corbicular size in workers from honeybee lines selected for high or low pollen hoarding. *Journal of Apicultural Research*, 25(1), 50-52. DOI: 10.1080/00218839.1986.11100691
- Minami, A., Kang, X., y Carter, C.J. 2021. A cell wall invertase controls nectar volume and sugar composition. *The Plant Journal*. DOI: 10.1111/tpj.15357
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de Argentina (MAGyP). 2016. *Mercado de semillas para la siembra de granos en Argentina*. https://magyp.gob.ar/new/0-programas/dma/granos/Informe%20Semillas_Agosto%202016.pdf
- Montenegro, G., Gomez M. y Ávila G. 1992. Importancia relativa de especies cuyo polen es utilizado por *Apis mellifera* en el área de la Reserva Nacional de los Ruiles. VII. Region de Chile. *Acta Botanica Malacitana* 17, 174-177. https://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/3344/17_Montenegro.pdf?sequence=5
- Monzón, V.H., Bosch, J. y Retana, J. 2004. Foraging behavior and pollinating effectiveness of *Osmia cornuta* (Hymenoptera: Megachilidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) on "Comice" pear. *Apidologie*, 35(6), 575-585. DOI: 10.1051/apido:2004055

- Morgado, L.N., Carvalho, C.F., Souza, B. y Santana, M.P. 2002. Fauna of bees (Hymenoptera: Apoidea) on sunflower flowers, *Helianthus annuus* L., in Lavras, Minas Gerais, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia (Brazil)*.
- Mormeneo I. 2003. Caracterización climática de Bahía Blanca. Cátedra de Climatología, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. <http://agrometeorologia.criba.edu.ar/Downloads/Climatic.pdf>
- Morris, W.F., Vázquez, D.P. y Chacoff, N.P. 2010. Benefit and cost curves for typical pollination mutualisms. *Ecology*, 91, 1276–1285. DOI: 10.1890/08-2278.1
- Müller, A., Diener, S., Schnyder, S., Stutz, K., Sedivy, C. y Dorn, S. 2006. Quantitative pollen requirements of solitary bees: implications for bee conservation and the evolution of bee–flower relationships. *Biological conservation*, 130(4), 604-615. DOI: 10.1016/j.biocon.2006.01.023
- Muth, F., Francis, J.S. y Leonard, A.S. 2016. Bees use the taste of pollen to determine which flowers to visit. *Biology Letters*, 12(7) 20160356. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0356>
- Neff, J.L., y Simpson, B.B. 1990. The roles of phenology and reward structure in the pollination biology of wild sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae). *Israel Journal of Plant Sciences*, 39(1-2), 197-216. DOI: 10.1080/0021213X.1990.10677144
- Neov, B., Georgieva, A., Shumkova, R., Radoslavov, G. y Hristov, P. 2019. Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity*, 11(12), 237. DOI: 10.3390/d11120237
- Nepi, M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In *Nectaries and nectar* (129-166). Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-1-4020-5937-7_3
- Nepi, M., Ciampolini, F., y Pacini, E. 1996. Development and ultrastructure of *Cucurbita pepo* nectaries of male flowers. *Annals of Botany*, 78(1), 95-104. DOI: 10.1006/anbo.1996.0100
- Nepi, M., Cresti, L., Guarnieri, M., y Pacini, E. 2011. Dynamics of nectar production and nectar homeostasis in male flowers of *Cucurbita pepo* L. *International Journal of Plant Sciences*, 172(2), 183-190. DOI: 10.1086/657648
- Nepi, M., Franchi, G.G., y Padni, E. 2001. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*, 216(3-4), 171. DOI: 10.1007/BF02673869
- Nepi, M., Soligo, C., Nocentini, D., Abate, M., Guarnieri, M., Cai, G., Bini, L., Puglia, M., Bianchi, L. y Pacini, E. 2012. Amino acids and protein profile in floral nectar: much more than a simple reward. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(7), 475-481. DOI: 10.1016/j.flora.2012.06.002
- Nicolson, S. W. 1995. Direct demonstration of nectar reabsorption in the flowers of *Grevillea robusta* (Proteaceae). *Functional Ecology*, 584-588. DOI: 10.2307/2390148
- Nicolson, S.W. y Human, H. 2013. Chemical composition of the 'low quality' pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Apidologie*, 44(2), 144-152. DOI: 10.1007/s13592-012-0166-5
- Nicolson, S.W., y Thornburg, R.W. 2007. *Nectar chemistry*. En Nicolson, S.W., Nepi, M., y Pacini, E. (Eds.). *Nectaries and nectar* (pp. 215-264). Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-1-4020-5937-7_5
- Nielsen, L.R., Philipp, M. y Siegismund, H.R. 2002. Selective advantage of ray florets in *Scalesia affinis* and *S. pedunculata* (Asteraceae), two endemic species from the Galápagos. *Evolutionary Ecology*, 16(2), 139-153. DOI: 10.1023/A:1016301027929
- O'Neal, R.J. y Waller, G.D. 1984. On the pollen harvest by the honey bee (*Apis mellifera* L.) near Tucson, Arizona (1976–1981). *Desert Plants* 6, 81–109. https://repository.arizona.edu/bitstream/handle/10150/552253/dp_06_02-081-094.pdf?sequence=1

- Oberle, G.D., y Goertzen, K.L. 1952. A method for evaluating pollen production of fruit varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* (59) 263-265.
- Odoux, J.F., Aupinel, P., Gateff, S., Requier, F., Henry, M. y Bretagnolle, V. 2014. ECOBEE: A tool for long-term honeybee colony monitoring at the landscape scale in West European intensive agroecosystems. *Journal of Apicultural Research*, 53, 57–66. DOI: 10.3896/IBRA.1.53.1.05
- Ollerton, J. 1999. La evolución de las relaciones polinizador-planta en los artrópodos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26, 741-758.
- Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO). 1 de agosto de 2021. *FAOSTAT-Cultivos y productos de ganadería*. <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QCL/visualize>
- Oz, M., Karasu, A., Cakmak, I., Goksoy, A.T. y Turan, Z.M. 2009. Effects of honeybee (*Apis mellifera*) pollination on seed set in hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 8 (6).
- Pacheco, J. y Breed, M.D. 2008. Sucrose-response thresholds and the expression of behavioural tasks by middle-aged honeybee workers. *Animal behaviour*, 76(5), 1641-1646. DOI: 10.1016/j.anbehav.2008.08.001
- Pacini, E. 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9(6), 362. DOI: 10.1007/BF02441957
- Pacini, E. 2000. From anther and pollen ripening to pollen presentation. In *Pollen and pollination* (pp. 19-43). Springer, Vienna. DOI: 10.1007/978-3-7091-6306-1_2
- Pacini, E., Nepi, M., y Vesprini, J.L. 2003. Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, 238(1-4), 7-21. DOI: 10.1007/s00606-002-0277-y
- Pappers, S.M., de Jong T.J., Klinkhamer P.G. y Meelis E. 1999. Effects of nectar content on the number of bumblebee approaches and the length of visitation sequences in *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos*. 87, 580–586. DOI: 10.2307/3546822
- Parachnowitsch, A.L., Manson, J.S. y Sletvold, N. 2019. Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany*, 123(2), 247-261. DOI: 10.1093/aob/mcy132
- Pate, J.S., Peoples, M.B., Storer, P.J., y Atkins, C.A. 1985. The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) II. Nectar composition, origin of nectar solutes, and nectary functioning. *Planta*, 166(1), 28-38. DOI: 10.1007/BF00397382
- Patil, D.H., Shankar, M.A., Shadakshari, Y.G. y Krishnamurthy, N. 2018. Studies on site specific nutrient management (SSNM) on hybrid sunflower seed production in Southern Karnataka. *Journal of Applied and Natural Science*, 10(1), 379-385. DOI: 10.31018/jans.v10i1.1634
- Paudel, Y. P., Mackereth, R., Hanley, R. y Qin, W. 2015. Honey bees (*Apis mellifera* L.) and pollination issues: Current status, impacts, and potential drivers of decline. *Journal of Agricultural Science*, 7(6), 93. DOI: 10.5539/jas.v7n6p93
- Peña Zubiarte C., Anderson D. y Demmi, M. 1998. *Carta de suelos y vegetación de la provincia de San Luis*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, INTA y Gobierno de la provincia de San Luis, pp. 115.
- Pernal, S.F. y Currie, R.W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31(3), 387-409. DOI: 10.1051/apido:2000130
- Pernal, S.F. y Currie, R.W. 2001. The influence of pollen quality on foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 51(1), 53-68. DOI: 10.1007/s002650100412
- Pernal, S.F. y Currie, R.W. 2002. Discrimination and preferences for pollen-based cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour*, 63(2), 369-390. DOI: 10.1006/anbe.2001.1904

- Perrot, T., Gaba, S., Roncoroni, M., Gautier, J.L., Saintilan, A., y Bretagnolle, V. 2019. Experimental quantification of insect pollination on sunflower yield, reconciling plant and field scale estimates. *Basic and applied ecology*, 34, 75-84. DOI: 10.1016/j.baae.2018.09.005
- Petanidou, T., Goethals, V. y Smets, E. 2000. Nectary structure of Labiatae in relation to their nectar secretion and characteristics in a Mediterranean shrub community—Does flowering time matter?. *Plant Systematics and Evolution*, 225(1-4), 103-118. DOI: 10.1007/BF00985461
- Pham-Delègue, M.H., Loublier, Y., Ducruet, V., Douault, P., Marilleau, R., y Etiévant, P. 1994. Caracterisation de signaux chimiques impliqués dans les relations plantes-abeilles domestiques. *Grana*, 33(4-5), 184-190. DOI: 10.1080/00173139409428999
- Piffanelli, P., Ross, J.H. y Murphy, D.J. 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual plant reproduction*, 11(2), 65-80. DOI: 10.1007/s004970050122
- Pinheiro-Costa, B.K., Mesquita-Neto, J.N., Rego, J.O., y Schlindwein, C. 2018. Trade off between quantity and size of pollen grains in the heterandrous flowers of *Senna pendula* (Fabaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 32(3), 446-453. DOI: 10.1590/0102-33062018abb0132
- Portlas, Z.M., Tetlie, J.R., Prischmann-Voldseth, D., Hulke, B.S. y Prasifka, J.R. 2018. Variation in floret size explains differences in wild bee visitation to cultivated sunflowers. *Plant Genetic Resources*, 16(6), 498-503. DOI: 10.1017/S1479262118000072
- Potts, S.G., Vulliamy, B., Dafni, A., Ne'eman, G. y Willmer, P. 2003. Linking bees and flowers: how do floral communities structure pollinator communities?. *Ecology*, 84(10), 2628-2642. DOI: 10.1890/02-0136
- Praggh, I., Van, J.P., Brinkschmidt, B., Eder, J. y Rembold, H. 1987. Pollen collecting behavior of *Apis mellifera* in a bee flight room. *Chemistry and biology of social insects*, 571-572.
- Prasifka, J.R., Mallinger, R.E., Portlas, Z.M., Hulke, B.S., Fugate, K.K., Paradis, T., Hampton, M.E. y Carter, C.J. 2018. Using nectar-related traits to enhance crop-pollinator interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 812. DOI: 10.3389/fpls.2018.00812
- Pressman, E., Peet, M.M. y Pharr, D.M. 2002) The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany*, 90(5), 631-636. DOI: 10.1093/aob/mcf240
- Putt, E.D. 1940. Observations on morphological characters and flowering processes in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Scientific Agriculture*, 21(4), 167-179. DOI: 10.4141/sa-1940-0073
- Pyke, G.H. 1991. What does it cost a plant to produce floral nectar?. *Nature*, 350(6313), 58-59. DOI: 10.1038/350058a0
- Pyke, G.H., Pulliam, H.R., y Charnov, E.L. 1977. Optimal foraging: a selective review of theory and tests. *The quarterly review of biology*, 52(2), 137-154. https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1014&context=biol_fsp
- Rabie, A. L., Wells, J.D. y Dent, L.K. 1983. The nitrogen content of pollen protein. *Journal of apicultural research*, 22(2), 119-123. DOI: 10.1080/00218839.1983.11100572
- Rader, R., Edwards, W., Westcott, D.A., Cunningham, S.A. y Howlett, B.G. 2013. Diurnal effectiveness of pollination by bees and flies in agricultural *Brassica rapa*: Implications for ecosystem resilience. *Basic and Applied Ecology*, 14(1), 20-27. DOI: 10.1016/j.baae.2012.10.011
- Raguso, R. A. 2004. Flowers as sensory billboards: progress towards an integrated understanding of floral advertisement. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 434-440. DOI: 10.1016/j.pbi.2004.05.010
- Rao, G.U., Jain, A. y Shivanna, K.R. 1992. Effects of high temperature stress on *Brassica* pollen: viability, germination and ability to set fruits and seeds. *Annals of botany*, 69(3), 193-198. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088329

- Raw, G.R. 1953. The effect on nectar secretion of removing nectar from flowers. *Bee World*, 34(2), 23-25. DOI: 10.1080/0005772X.1953.11094777
- Razzaq, H., Kanwal, S., Tahir, M. y Sadia, B. 2015. Effects of spring and autumn seasons on the variability among sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions for pollen viability, germination and morphology. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6 (1).
- Richards, A. J. (2001). Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield?. *Annals of botany*, 88(2), 165-172. DOI: 10.1006/anbo.2001.1463
- Richardson, L.L., Adler, L.S., Leonard, A.S., Andicoechea, J., Regan, K.H., Anthony, W.E., Manson, J. S y Irwin, R.E. 2015. Secondary metabolites in floral nectar reduce parasite infections in bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1803), 20142471. DOI: 10.1098/rspb.2014.2471
- Rodriguez-Riano, T. y Dafni, A. 2000. A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12(4), 241-244. DOI: 10.1007/s004970050008
- Roldan-Serrano, A.S., y Guerra-Sanz, J.M. 2005. Reward attractions of zucchini flowers (*Cucurbita pepo* L.) to bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *European Journal of Horticultural Science*, 70(1), 23-28. https://www.pubhort.org/ejhs/2005/file_20822.pdf
- Rollin, O., y Garibaldi, L.A. 2019. Impacts of honeybee density on crop yield: A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, 56(5), 1152-1163. DOI: 10.1111/1365-2664.13355
- Romito, A., D'Amico, J.P., Paredes, D., Roba, M., Colombo, C., Pollacino, J., Pincu, M. y Tesouro, O. 2009. Efecto de la uniformidad del tamaño de la semilla de girasol (*Helianthus annuus* L.) sobre la precisión del sistema dosificador mecánico de placas alveoladas de fondo plano. Informe técnico de siembra No. 10, INTA. ISSN 1852-3080.
- Roulston, T.H., Cane, J.H. y Buchmann, S.L. 2000. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny?. *Ecological monographs*, 70(4), 617-643. DOI: 10.1890/0012-9615(2000)070[0617:WGPCOP]2.0.CO;2
- Roulston, T.H. y Cane, J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222: 187-209. DOI: 10.1007/978-3-7091-6306-1_10
- Roy, R., Schmitt, A.J., Thomas, J.B., y Carter, C.J. 2017. Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science*, 262, 148-164. DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.04.012
- Ruzin, S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy* (Vol. 198). New York: Oxford University Press. https://www.researchgate.net/profile/Nigel-Chaffey/publication/229839060_Plant_microtechnique_and_microscopyBy_Steven_E_Ruzin_xi322_pages_Oxford_UK_Oxford_University_Press_1999_3250_pb_ISBN_0_19_508956_1/links/5b38b59da6fdcc8506e4501f/Plant-microtechnique-and-microscopyBy-Sтивен-E-Ruzin-xi-322-pages-Oxford-UK-Oxford-University-Press-1999-3250-p-b-ISBN-0-19-508956-1.pdf
- Sáez, A., Morales, C.L., Ramos, L.Y. y Aizen, M.A. 2014. Extremely frequent bee visits increase pollen deposition but reduce drupelet set in raspberry. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1603–1612. DOI: 10.1111/1365-2664.12325
- Said, F., Inayatullah, M. y Hussain, A. (2017). Studies on visitation pattern of honeybee (Hymenoptera: Apidae) and its impact on the yield and oil contents of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed in Peshawar valley, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 49(3). DOI: 10.17582/journal.pjz/2017.49.3.943.949
- Salazar Lea Plaza, J.C. y Moscatelli, G. 1985. Mapa de suelos de la provincia de Buenos Aires, INTA SAGPYA, Buenos Aires, Argentina.

- Sammataro D., Flottum P.K., y Erickson E.H. 1984. Factors contributing to honey bee preferences in sunflower varieties. *Proceedings Sunflower Research Workshop*. USA National Sunflower Association. 20– 21.
- Sammataro, D., Erickson Jr, E.H. y Garment, M.B. 1985. Ultrastructure of the sunflower nectary. *Journal of Apicultural Research*, 24(3), 150-160. DOI: 10.1080/00218839.1985.11100665
- Sammataro, D., Erickson, E.H. y Garment, M. 1983. Intervarietal structural differences of sunflower (*Helianthus annuus*) florets and their importance to honey bee visitation. *Proceedings Sunflower Research Workshop*. USA National Sunflower Association. 4-5.
- Sammataro, D., Flottum, P.K. y Erickson, E.H. 1984. *Factors contributing to honeybee preferences in sunflower varieties*. In: Proceedings of the Sunflower Research Workshop, Bismarck, ND. Natl. Sunflower Association.
- Sammataro, D., Garment, M.B., y Erickson Jr, E.H. 1986. Anatomical features of the sunflower floret. *Reprints-US Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USA)*. 25-31.
- Sánchez, R.M. 2011. Historia de la evolución de las condiciones ambientales de los partidos bonaerenses Villarino y Patagones. En *Jornada sobre "Evolución y Futuro del Desarrollo de Producciones Agrícola-Ganaderas en el SO Bonaerense"* p.362-372.
- Sánchez, R., Pezzola, N. y Cepeda, J. (1998). *Caracterización edafoclimática del área de influencia del INTA E.E.A. Ascasubi*. INTA, pp. 11.4
- Sato, S., Peet, M.M. y Thomas, J.F. 2002. Determining critical pre-and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1187-1195. DOI: 10.1093/jexbot/53.371.1187
- Schiestl, F.P. y Johnson, S.D. 2013. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in ecology & evolution*, 28(5), 307-315. DOI: 10.1016/j.tree.2013.01.019
- Schmid, R. 1988. Reproductive versus extra-reproductive nectaries—historical perspective and terminological recommendations. *The Botanical Review*, 54(2), 179-227. DOI: 10.1007/BF02858528
- Schmidt, J.O. y Johnson, B.E. 1984. Pollen feeding preference of *Apis mellifera*, a polylectic bee [Honeybee nutrition]. *Southwest Entomology*, USA. 9(1), 41–47.
- Schmidt, L.S., Schmidt, J.O., Rao, H., Wang, W. y Xu, L. 1995. Feeding preference and survival of young worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) fed rape, sesame, and sunflower pollen. *Journal of Economic Entomology*, 88(6), 1591-1595. DOI: 10.1093/jee/88.6.1591
- Schneiter AA. (Ed.) 1997. Sunflower Technology and Production. ASA-CSSA-SSSA, Wisconsin. USA.
- Schneiter, A.A., y Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages 1. *Crop Science*, 21(6), 901-903. DOI: 10.2135/cropsci1981.0011183X002100060024x
- Seeley, T.D. 1985. Honey bee ecology Princeton University Press. *New Jersey*.
- Seiler, G. J. (1997). Anatomy and morphology of sunflower. In *Sunflower technology and production*, 35, 67-111. DOI:10.2134/agronmonogr35.c3
- Segarra, L. 2020. Floral trait architecture in crop sunflower (*Helianthus annuus* L) under drought conditions (Master Thesis, Central Washington University)
- Segarra, L. 2020. Floral trait architecture in crop sunflower (*Helianthus annuus*) under drought conditions. (Master Thesis, Central Washington University). <https://digitalcommons.cwu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2367&context=etd>
- Sharma, B. y Bhatla, S.C. 2013. Structural analysis of stigma development in relation with pollen–stigma interaction in sunflower. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 208(7), 420-429. DOI: 10.1016/j.flora.2013.07.003

- Shein, S.E., Sargent, S.J. y Miko, J. 1980) An evaluation of differential attractiveness of sunflower genotypes to honeybees. *In Proceedings of the 9th International Sunflower Conference*, Torremolinos, Spain, 1980. (pp. 216-220).
- Shivanna, K.R. y Cresti, M. 1989. Effects of high humidity and temperature stress on pollen membrane integrity and pollen vigour in *Nicotiana tabacum*. *Sexual Plant Reproduction*, 2(3), 137-141. DOI: 10.1007/BF00192759
- Shivanna, K.R. y Heslop-Harrison, J. 1981. Membrane state and pollen viability. *Annals of Botany*, 47(6), 759-770. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086075
- Shivanna, K.R., Linskens, H.F. y Cresti, M. 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(1), 38-42. DOI: 10.1007/BF00226109
- Shmida, A., y Kadmon, R. 1991. Within-plant patchiness in nectar standing crop in *Anchusa strigosa*. *Vegetatio*, 94(2), 95-99. DOI: 10.1007/BF00032623
- Silva, L.F.O., Zambon, C.R., Pio, R., Oliveira, A.F.D., y Gonçalves, E.D. 2016. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. *Bragantia*, 75(1), 26-32. DOI: 10.1590/1678-4499.213
- Simón-Porcar, V.I., Abdelaziz, M. y Arroyo, J. 2018. El papel de los polinizadores en la evolución floral: una perspectiva mediterránea. *Revista Ecosistemas*, 27(2), 70-80. DOI.: 10.7818/ECOS.1433
- Simpson, B.B., y Neff, J.L. 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri botanical Garden*, 301-322. DOI: 10.2307/2398800
- Singh, J., Agarwal, O.P. y Mishra, R.C. 2006. Foraging rates of different Apis species visiting parental lines of Brassica napus L. *Zoo's Print J*, 21(4), 2226-2227. <https://zoosprint.zooreach.org/ZooPrintJournal/2006/April/2226-2227.pdf>
- Sinsawat, V. y Steer, B.T. 1993. Growth of florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in relation to their position in the capitulum, shading and nitrogen supply. *Field Crops Research*, 34(1), 83-100. DOI: 10.1016/0378-4290(93)90113-2
- Smets, E. 1986. Localization and systematic importance of the floral nectaries in the Magnoliatae (Dicotyledons). *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique/Bulletin van de Nationale Plantentuin van Belgie*, 51-76. DOI: 10.2307/3667757
- Smets, E.F. y Cresens, E.M. 1988. Types of floral nectaries and the concepts 'character' and 'character-state'—a reconsideration. *Acta Botanica Neerlandica*, 37(1), 121-128. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1988.tb01586.x
- Soil Survey Staff 1960. Soil classification-A comprehensive system (7th Approximation). *US Dept. Agric. Washington: US Govt. Printing Office*.
- Somerville, D.C. y Nicol, H.I. 2006. Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), 141-149. DOI: 10.1071/EA03188
- Southwick, E.E. 2019. Nectar biology and pollinator attraction in the north temperate climate. En M.C. D. Breed, Michener, C. y Evans, H.E. (eds) *The biology of social insects*. CRC Press. 19-23.
- Souza, C.V., Nepi, M., Machado, S.R., y Guimarães, E. 2017. Floral biology, nectar secretion pattern and fruit set of a threatened Bignoniaceae tree from Brazilian tropical forest. *Flora*, 227, 46-55. DOI: 10.1016/j.flora.2016.12.007
- Stanley, R.G. y Linskens, H.F. 1974. Pollen: Biology. *Biochemistry, Management*. Springer-Verlag, New York.

- Stebbins, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1(1), 307-326. DOI: 10.1146/annurev.es.01.110170.001515
- Stephens, D.W. 1981. The logic of risk-sensitive foraging preferences. *Animal Behaviour*. 29, 628-629. DOI: 10.1016/S0003-3472(81)80128-5
- Stephens, D.W., y Krebs, J.R. 1986. *Foraging theory* (Vol. 1). Princeton University Press.
- Stone, J.L., Thomson, J.D., y Dent-Acosta, S.J. 1995. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. *American Journal of Botany*, 82(9), 1186-1197.
- Stuessy, T.F., Spooner, D.M. y Evans, K.A. 1986. Adaptive significance of ray corollas in *Helianthus grosseserratus* (Compositae). *American Midland Naturalist*, 191-197. DOI: 10.1111/ele.12386
- Susic Martin C. y Farina W.M. 2016. Honeybee floral constancy and pollination efficiency in sunflower (*Helianthus annuus*) crops for hybrid seed production. *Apidologie*; 47(2): 161–170. DOI: 10.1007/s13592-015-0384-8
- Szemruch C., Rondanini D.P., Renteria S., Ferrari L. y Cantamutto M.A. 2014. Impacto del ambiente materno y la cosecha anticipada en la calidad de semillas de girasol. *Rev. Divulg. Técn. Agrop. Agroind. Amb.* FCA Vol. 1(1), 38 -40. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/18691/CONICET_Digital_Nro.20611.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Tasei, J.N. y Aupinel, P. 2008. Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 39(4), 397-409. DOI: 10.1051/apido:2008017
- Taylor, L.P. y Hepler, P.K. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annual review of plant biology*, 48(1), 461-491. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.461
- Tepedino, V.J. y Parker, F.D. 1982. Interspecific differences in the relative importance of pollen and nectar to bee species foraging on sunflowers. *Environmental Entomology*, 11(1), 246-250. DOI: 10.1093/ee/11.1.246
- Teuber, L.R., Albertsen, M.C., Barnes, D.K. y Heichel, G.H. 1980. Structure of floral nectaries of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in relation to nectar production. *American Journal of Botany*, 67(4), 433-439. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1980.tb07670.x
- Thakar, J.D., Kunte, K., Chauhan, A.K., Watve, A.V., y Watve, M.G. 2003. Nectarless flowers: ecological correlates and evolutionary stability. *Oecologia*, 136(4), 565-570. DOI: 10.1007/s00442-003-1304-6
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., y Pichersky, E. 2005. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *The Plant Journal*, 42(5), 757-771. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02417.x
- Thom, C., Seeley, T.D. y Tautz, J. 2000. A scientific note on the dynamics of labor devoted to nectar foraging in a honey bee colony: number of foragers versus individual foraging activity. *Apidologie*, 31(6), 737-738. <https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2000/06/m0605.pdf>
- Thompson, J.D. 2001. How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system?. *Oecologia*, 126(3), 386-394. DOI: 10.1007/s004420000531
- Thornburg, R.W., Carter, C., Powell, A., Mittler, R., Rizhsky, L., y Horner, H.T. 2003. A major function of the tobacco floral nectary is defense against microbial attack. *Plant Systematics and Evolution*, 238(1-4), 211-218. DOI: 10.1007/s00606-003-0282-9

- Thornthwaite, C.W. 1958. Introduction to arid zone climatology. En: *Climatology and Microclimatology* (Proceed. of Canberra Symp.), UNESCO, Paris. Pp. 15-22.
- Thorp, R.W. 2000. The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution*. 222: 211-233.
- Todorova, M., Nenova, N. y Encheva, J. 2004. Study on in vitro pollen germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.) before and after gamma-irradiation. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 10, 65-70.
- Torres, C. 2000. Pollen size evolution: correlation between pollen volume and pistil length in Asteraceae. *Sexual Plant Reproduction*, 12(6), 365-370. DOI: 10.1007/s004970000030
- Torres, C. y Galetto, L. (1998). Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 127(3), 207-223. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1998.tb02098.x
- Torretta, J.P., Medan, D., Roig Alsina, A.H. y Montaldo, N.H. 2010. Visitantes florales diurnos del girasol (*Helianthus annuus* L., Asterales: Asteraceae) en la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69(1-2), 17-32.
https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/15871/CONICET_Digital_Nro.19263_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Torretta, J.P., Navarro, F., y Medan, D. 2009. Visitantes florales nocturnos del girasol (*Helianthus annuus*, Asterales: Asteraceae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 68(3-4), 339-350.
- Tourn, E. 2013). *Recompensas florales de Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Tourn, E., Andrada, A., Gallez, L., Armaza, A. y Pellegrini C. 2010. Número de granos de polen por flor en *Diplotaxis tenuifolia* L.: uso del hemocitómetro. *XIII Simpósio Brasileiro de Paleobotánica e Palinología*. Salvador, Brasil. 114.
- Vaissière, B.E. y Vinson, S.B. 1994. Pollen morphology and its effect on pollenl collection by honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), with special Reference to Upland Cotton, *Gossypium hirsutum* L.(Malvaceae). *Grana*, 33(3), 128-138. DOI: 10.1080/00173139409428989
- van der Moezel, P.G., Delfs, J.C., Pate, J.S., Loneragan, W.A. y Bell, D.T. 1987. Pollen selection by honeybees in shrublands of the Northern Sandplains of Western Australia. *Journal of Apicultural Research*, 26(4), 224-232. DOI: 10.1080/00218839.1987.11100764
- Van der Pijl, L. 1961. Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution*, 44-59. DOI: 10.2307/2405842
- Vear, F., Pham-Delegue, M.H., de Labrouhe, D.T., Marilleau, R., Loubliey, Y., y Le Métayer, M. 1990. Genetical studies of nectar and pollen production in sunflower. *Agronomie*, 10(3), 219-231. Recuperado de: <https://hal.inrae.fr/hal-02713929/document>
- Vicens, N. y Bosch, J. 2000. Weather-dependent pollinator activity in an apple orchard, with special reference to *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae and Apidae). *Environmental Entomology*, 29(3), 413-420. DOI: 10.1603/0046-225X-29.3.413
- Vithanage H.I. y Knox R.B. 1977 Development and cytochemistry of stigma surface and response to self- and foreign pollination in *Helianthus annuus*. *Phytomorphology* 27: 168–179.
- Vogel, S. 1977. Nectaries and their ecological significance. *Apidologie*, 8, 321–336
- Vogler, D.W., Peretz, S. y Stephenson, A G. 1999. Floral plasticity in an iteroparous plant: the interactive effects of genotype, environment, and ontogeny in *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae). *American Journal of Botany*, 86(4), 482-494. DOI: 10.2307/2656809
- Von Frisch, K. 1967. The dance language and orientation of bees. Harvard University Press.

- Waddington, K.D. y Herbst, L.H. 1987. Body size and the functional length of the proboscis of honey bees. *Florida Entomologist*, 124-128.
- Waddington, K.D. y Holden, L.R. 1979. Optimal foraging: on flower selection by bees. *The American Naturalist*, 114(2), 179-196.
- White, A.D., Owen, M.D., Hartzler, R.G., y Cardina, J. 2002. Common sunflower resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Weed Science*, 432-437. DOI: 10.2307/4046524
- Whitted, E. 2019. *Evaluating the relationship of pollinator attractiveness to floret length in inbred sunflower (Helianthus annuus, Asteraceae) lines*. Master of science, Iowa State University
- Winschel C.I. 2017. *Integración por medio de Geotecnologías de la información ambiental en estudios de degradación de los suelos para los partidos de Villarino y Patagones, Provincia de Buenos Aires, Argentina*. Tesis doctoral. Departamento de Geografía, UNS.
- Wodehouse, R.P. 1935. Pollen Grains, New York.
- Wojtaszek, J.W. y Maier, C. 2014. A microscopic review of the sunflower and honeybee mutualistic relationship. *Int. J. AgriSci*, 4(5), 272-282. https://www.researchgate.net/profile/Camelia-Maier/publication/268075987_A_Microscopic_Review_of_the_Sunflower_and_Honeybee_Mutualistic_Relationship/links/5460df090cf2c1a63bff7533/A-Microscopic-Review-of-the-Sunflower-and-Honeybee-Mutualistic-Relationship.pdf
- Wolff, D. 2006. Nectar sugar composition and volumes of 47 species of Gentianales from a southern Ecuadorian montane forest. *Annals of Botany*, 97(5), 767-777. DOI: 10.1093/aob/mcl033
- Yadav, R.N., Sinha, S.N. y Singhal, N.C. 2002. Honeybee (*Apis* spp.) pollination in sunflower hybrid seed production: Effect of planting design on honeybee movement and its operational area. *Apimondia Standing Commission of Pollination and Bee Flora*. <http://www.fiiitea.org/foundation/files/437.pdf>
- Young, H.J. y Young, T.P. 1992. Alternative outcomes of natural and experimental high pollen loads. *Ecology*, 73(2), 639-647. DOI: 10.2307/1940770
- Zajác, E. 2011. *Nectar production and some site-related issues of sunflower hybrids under different agro-ecological conditions*. Tesis doctoral. Szent Istvan University. Hungary. http://archivum.szie.hu/JaDoX_Portlets/documents/document_13334_section_13672.pdf
- Zar, J.H. 2009. Biostatistical analysis, 4th impression. *Dorling Kindersley (India) Pvt. Ltd., Delhi*, 110, 92.
- Zhao, Z., Lu, N., y Conner, J.K. 2016. Adaptive pattern of nectar volume within inflorescences: bumblebee foraging behavior and pollinator-mediated natural selection. *Scientific reports*, 6(1), 1-8. DOI: 10.1038/srep34499
- Zimmerman, M. 1983. Plant reproduction and optimal foraging: experimental nectar manipulations in *Delphinium nelsonii*. *Oikos*, 57-63. DOI: 10.2307/3544346