



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMÍA

**Polinización y polinizadores de colza y especies espontáneas de Brassicaceae: su
incidencia en la producción**

Luciano Alberto Marinozzi

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2023

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor 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 durante el período comprendido entre marzo del 2016 y agosto del 2023, bajo la dirección de la Dra. Ana C. Andrada la co-dirección de la Dra. Soledad C. Villamil

Luciano A. Marinozzi



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

A mi papá y a mi hijo.

Agradecimientos

- A la Doctora Ana Andrada, directora de esta tesis, por haberme transmitido conocimientos valiosos, por colaborar a lo largo de todo el trabajo, por su buena predisposición y por la corrección de este manuscrito.
- A la Doctora Soledad Villamil, co-directora de esta tesis, por haberme acompañado en cada etapa, desde el muestreo hasta la escritura de esta tesis, confiar en mí y por su estímulo constante para seguir adelante en momentos personales difíciles.
- A la Mg. Ing. Agr. Liliana M. Gallez, directora del Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA) del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS), lugar en el que realicé la tesis, por abrirme las puertas del LabEA, permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por brindarme incansablemente sus conocimientos para potenciar mi aprendizaje.
- A la Ingeniera Liliana Iriarte por su enorme predisposición, poner a mi disposición su lugar de trabajo y ayudarme en los ensayos a campo en la Chacra Experimental INTA Barrow.
- Al equipo del LabEA, por su apoyo incondicional. Agradezco en particular a Leti, Ceci, Gise, Pili, Juan, Agus y Mati por los buenos momentos compartidos en las jornadas de trabajo.
- A Julio Miguens por la ayuda brindada en los muestreos y su excelente predisposición.
- A Rocío Gonzalez Vaquero por la colaboración en la identificación de los ejemplares muestreados.
- A los alumnos que me acompañaron en los muestreos Joaquín, Javier, Emelina, Maximiliano, Facundo y Gonzalo.
- A los jurados de esta tesis, por la corrección de este manuscrito.
- Al Departamento de Agronomía de la UNS, por ser mi lugar de trabajo durante el doctorado.
- A la Universidad Nacional del Sur, por brindarme la posibilidad de realizar el doctorado.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), por otorgarme las becas de posgrado.
- A Guille, mi compañera de vida, por su amor y porque pronto seremos más en esta hermosa familia.

- A mis hermanos Cris y Pame, por estar siempre juntos y apoyarme en los momentos difíciles.
- A mis sobrinos, Joaqui y Luquita, que los amo con todo mi corazón.
- A mi papá Alberto, que lo extraño todos los días, y a mi mamá Cristina, por su amor incondicional y por enseñarme los valores que me definen como persona.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo 1: Introducción general	4
Antecedentes e importancia	4
Hipótesis	11
Objetivos.....	11
Capítulo 2: Visitantes florales en el cultivo de colza en el centro sur bonaerense	12
Introducción	12
Materiales y métodos	15
Resultados y discusión.....	19
Conclusiones.....	27
Capítulo 3: Diversidad y abundancia de visitantes florales en colza y brasicáceas espontáneas	28
Introducción	28
Materiales y métodos	30
Resultados y discusión.....	33
Conclusiones.....	44
Capítulo 4: Carga polínica y tamaño del cuerpo de los principales visitantes florales del cultivo de colza en el centro sur bonaerense.....	45
Introducción	45
Materiales y métodos	49
Resultados y discusión.....	51
Conclusiones.....	57

Capítulo 5: Efecto de la polinización entomófila sobre el rendimiento del cultivo de colza, <i>Brassica napus</i> L.....	59
Introducción	59
Materiales y métodos	63
Resultados y discusión.....	68
Conclusiones	75
Capítulo 6: Germinabilidad del polen de colza en colmenas de <i>Apis mellifera</i> L.	77
Introducción	77
Materiales y métodos	80
Resultados y discusión.....	84
Conclusiones	89
Consideraciones finales y perspectivas.....	90
Bibliografía	93

Resumen

Entre todas las especies de brasicáceas, la de mayor importancia es *Brassica napus* L. (colza), que se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles. Muchas especies de brasicáceas, cultivadas y silvestres, no sólo tienen importancia en la alimentación humana, sino que han sido mencionadas como fuentes de polen y néctar. Es decir, que el solo hecho de formar parte de la comunidad vegetal aumenta las posibilidades de alimento para un gran número de polinizadores y visitantes florales. La presencia de visitantes florales de brasicáceas en el centro-sur de la Provincia de Buenos Aires (República Argentina) fue evaluada en parcelas de colza y en parches de brasicáceas espontáneas ubicados en la localidad de Tres Arroyos, en la Chacra Experimental Integrada Barrow (-38.319305, -60.239380). Para realizar los muestreos se utilizaron redes entomológicas, trampas de agua de colores y el método de observación directa. Además, con el objetivo de determinar el efecto de los polinizadores sobre el rendimiento y sus componentes, en las parcelas de colza se colocaron jaulas excluidoras de polinizadores. Otra parte del trabajo se realizó en dependencias del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur con el fin de evaluar la germinabilidad *in vitro* del polen expuesto a condiciones ambientales de la colmena. Para esto, se seleccionaron colmenas de *Apis mellifera* L. y se colocaron en su interior muestras de polen de colza que se obtuvieron de plantas cultivadas en macetas de 10 litros. En la zona de estudio se comprobó que numerosas especies de insectos, de diversas familias y órdenes, visitaron el cultivo de colza al igual que los parches de especies espontáneas. Todas las especies capturadas se encontraron tanto en el cultivo como en las malezas aledañas. Esto indica que los polinizadores utilizan ambos recursos. Las zonas con vegetación espontánea aledañas a las parcelas de colza presentaron una floración más extensa, brindando recursos a los visitantes florales antes, durante y después de la floración del cultivo. Los resultados de este trabajo muestran que la visita de insectos polinizadores en el cultivo de colza mejora la producción de semilla y esto se traduce en un mayor rendimiento, que es, en definitiva, el objetivo de todo productor. También se demostró que el aumento de rendimiento de semilla tuvo implicancia directa sobre la producción de aceite por hectárea, dado que la visita de los polinizadores mejoró la cantidad de semilla y no generó variaciones significativas en el tenor de materia grasa. Por otro lado, se demostró que las condiciones ambientales dentro de la colmena de *Apis mellifera* son adversas para la germinabilidad de los granos de polen de colza,

independientemente de las condiciones ambientales externas. Las zonas de cría son las de mayor temperatura y en 24 h no se registraron granos de polen con capacidad de germinar. A partir de las 48 h la capacidad de germinabilidad del polen disminuyó significativamente y el bajo porcentaje que germinó presentó tubos completamente atrofiados. Aunque el polen que se ubicó alejado de las zonas de cría mantuvo más tiempo su capacidad de germinar, sólo lo hizo por menos de 72 h. Los resultados de este trabajo respaldan una reducción sustancial del tiempo de carencia que exigen las empresas semilleras y abren la posibilidad de que se utilice una misma colmena en dos servicios de polinización consecutivos sin riesgo de contaminación por polen no deseado.

Abstract

Among all the species of brassicas, the most important one is *Brassica napus* L. (rapeseed), which stands out for its significant contribution to the global production of edible oils. Many species of brassicas, both cultivated and wild, are not only important for human consumption but have also been mentioned as sources of pollen and nectar. In other words, simply being part of the plant community increases the food possibilities for a large number of pollinators and floral visitors. The presence of brassica floral visitors in the central-southern region of Buenos Aires Province (Argentina) was evaluated in rapeseed plots and patches of spontaneous brassica plants located in Tres Arroyos, at the Chacra Experimental Integrada Barrow (-38.319305, -60.239380). Entomological nets, colored water traps, and direct observation methods were used for sampling. Additionally, exclusion cages were placed in the rapeseed plots to determine the effect of pollinators on yield and its components. Another part of the study was conducted at the Department of Agronomy, Universidad Nacional del Sur, to assess the *in vitro* germinability of pollen exposed to hive environmental conditions. Honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies were selected, and samples of rapeseed pollen obtained from plants cultivated in 10-liter pots were placed inside the hives. The study in the area confirmed that numerous insect species from different families and orders visited both the rapeseed crop and the patches of spontaneous species. All captured species were found in both the crop and the surrounding weeds, indicating that pollinators utilize both resources. The areas with spontaneous vegetation adjacent to the rapeseed plots exhibited more extensive flowering, providing resources for floral visitors before, during, and after the crop's flowering period. The results of this study demonstrate that the visitation of pollinating insects in the rapeseed crop improves seed production, ultimately resulting in higher yields, which is the goal of every

farmer. It was also shown that the increased seed yield directly impacted oil production per hectare, as pollinator visitation improved seed quantity without generating significant variations in fat content. On the other hand, it was demonstrated that the environmental conditions within the *Apis mellifera* hive are unfavorable for the germinability of rapeseed pollen grains, regardless of external environmental conditions. The brood areas have the highest temperatures, and within 24 hours, no pollen grains capable of germinating were recorded. From 48 hours onward, the germination capacity of the pollen significantly decreased, and the low percentage that did germinate exhibited completely atrophied tubes. Although pollen placed away from the brood areas maintained its germination capacity for a longer period, it did so for less than 72 hours. The results of this study support a substantial reduction in the required waiting time demanded by seed companies and open up the possibility of using the same hive for two consecutive pollination services without the risk of contamination by undesired pollen.

Capítulo 1: Introducción general

Antecedentes e importancia

El uso responsable de los recursos naturales para la producción de alimentos es uno de los grandes desafíos de la agricultura. Un agroecosistema puede ser visto como un área de cultivo con sectores no cultivados donde interactúan numerosos organismos, entre ellos las plantas y sus polinizadores. La actividad agrícola ha modificado el paisaje con grandes extensiones cultivadas que florecen en lapsos breves y ha disminuido sustancialmente las poblaciones de polinizadores, esta pérdida puede ser muy difícil de revertir. No se sabe la escala ni la magnitud de tiempo que implicaría una recolonización natural, ni cómo remediar la pérdida de polinizadores nativos en el caso de que eso fuese posible (Allen-Wardell *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2007; Garibaldi *et al.*, 2013). La producción de buena parte de nuestros alimentos depende de los polinizadores y ciertas prácticas agrícolas, como el uso intensivo de insecticidas, la deforestación, la destrucción del hábitat, el control de malezas nectaríferas y poliníferas, grandes superficies de monocultivos y otras alteraciones de los agroecosistemas, reducen peligrosamente sus poblaciones (Delaplane & Mayer, 2000; Klein *et al.* 2007).

La disminución de los polinizadores afecta negativamente a los ecosistemas naturales y también a los cultivos (Williams *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 2007). Excepto los cultivos autógamos y los polinizados por el viento, como los pertenecientes a la familia de las gramíneas (Poaceae) (trigo, arroz, cebada, caña de azúcar, maíz, etc), la gran mayoría son polinizados por insectos (Klein *et al.*, 2007; Gallai *et al.*, 2009; Garibaldi *et al.*, 2011; Roubik *et al.*, 2018). Es habitual que numerosas especies de insectos polinizadores visiten una misma planta entomófila, interactuando entre sí, y la desaparición de uno conlleva cambios en el comportamiento de otros (Brosi & Briggs, 2013). Para evaluar el impacto potencial de la pérdida de polinizadores sobre la agricultura para una región determinada es importante conocer los diferentes tipos de polinizadores, sobre todo los de mayor influencia y los que se observan con mayor frecuencia en los cultivos.

Según Klein *et al.* (2007), la información disponible sobre la biología de la polinización y los requisitos de polinizadores de muchos cultivos es escasa, especialmente cuando se consideran las diferencias entre las variedades modernas y la contribución de varias especies a la polinización. Los polinizadores nativos pueden aumentar la productividad de muchas especies

cultivadas y, por lo tanto, constituyen un importante recurso natural, a pesar de que sus poblaciones son, a veces, insuficientes para polinizar adecuadamente los cultivos. Las zonas agrícolas con escasa superficie de hábitats naturales están sufriendo pérdidas en la productividad debido a la falta de polinizadores nativos. De acuerdo a Morandin *et al.* (2005) las áreas de agricultura que exhiben estructuras paisajísticas homogéneas son perjudiciales para las poblaciones de abejas nativas y tienen menor potencial de producción que las áreas con vegetación diversa. Hasta la fecha, gran parte del debate se basó en evidencias provenientes de sistemas naturales y agrícolas principalmente norteamericanos y europeos y, en menor medida, centroamericanos y asiáticos (Garibaldi, 2014). Es interesante hacer notar que dos trabajos pioneros sobre el papel de la fragmentación del hábitat en la polinización de plantas nativas y sus poblaciones de polinizadores fueron realizados en Argentina (Aizen & Feinsinger, 1994 a, b).

Numerosas evidencias revelan la reducción de la diversidad y de la abundancia de polinizadores en distintas regiones del mundo. A finales del siglo XX, los científicos y otros observadores afirmaron que la tasa de extinción de especies de plantas y animales está aumentando a un ritmo alarmante (Wilson, 1992). Esta opinión no es universal (Simon & Wildavsky, 1992), pero en el caso de la superfamilia Apoidea (abejas) hay estudios que sugieren una pérdida de diversidad de especies. Sin dudas, es motivo de preocupación, no sólo considerando el valor económico de las abejas, sino también porque son esenciales para el funcionamiento de casi todos los ecosistemas terrestres. Además, el tamaño de sus poblaciones y la riqueza de especies pueden servir como bioindicadores del medio ambiente (Kevan, 1999).

Se sabe que, desde 1961 el área de cultivos dependientes de la polinización entomófila aumentó constantemente (Aizen *et al.*, 2008; Aizen *et al.*, 2009; Krell *et al.*, 2018; Roubik *et al.*, 2018; Aizen *et al.*, 2019). Se estima que una tercera parte de los alimentos depende, directa o indirectamente, de la polinización entomófila (Crane, 1990). El número de colmenas de abeja melífera está aumentando a un ritmo más lento que la creciente demanda de servicios de polinización (Aizen & Harder, 2009; Breeze *et al.*, 2014).

La importancia de las abejas en la producción de alimentos, a través de su acción polinizadora es menos conocida que la producción de miel y, sin embargo, es mucho más importante en la alimentación humana (Calderone, 2012). El 90% de los suministros de alimentos del ser humano está compuesto por productos básicos provenientes de 82 especies vegetales, de las cuales 77% son polinizadas en alguna proporción por abejas, que son el principal polinizador

en 48% de estos casos (Delaplane & Mayer, 2000). En general, el servicio de polinización es un insumo subvalorado en la producción agrícola.

La restauración de los servicios de polinización en áreas de agricultura intensiva requeriría recuperar parte de la vegetación espontánea, para proveer lugares para anidar y recursos florales para las abejas cuando no están utilizando los cultivos (Kremen *et al.*, 2002). Las áreas menos disturbadas son refugio de visitantes florales, entre ellos polinizadores y enemigos naturales de plagas, por lo que pueden fomentar la biodiversidad con su consecuente provisión de servicios ecosistémicos en los agroecosistemas (Montero, 2008). Por lo tanto, permitir el establecimiento de especies vegetales espontáneas en zonas no cultivadas cercanas a los cultivos sería, en definitiva, una forma de aumentar los recursos para especies de insectos benéficos.

Algunas especies vegetales tienen atributos que las convierten en buenas proveedoras de refugio y alimento de insectos polinizadores. Las brasicáceas o crucíferas (Brassicaceae) son una familia vegetal que incluye 338 géneros y 3.709 especies, distribuidas ampliamente en los más diversos climas alrededor del mundo (Al-Shehbaz *et al.*, 2006). Presentan una distribución mundial, incluyendo todos los continentes excepto la Antártida. La importancia económica y social de las brasicáceas se destaca por incluir especies que han sido cultivadas desde hace mucho tiempo para la alimentación humana, como fuente de aceite comestible, condimentos y productos hortícolas y también para aceites industriales. Entre todas las especies, sin duda las del género *Brassica* son las de mayor relevancia mundial, y actualmente *Brassica napus* L. (colza) es la más destacada por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles (FAOSTAT, 2022); mientras que como condimentos son utilizadas varias especies de mostazas, en especial *B. nigra* (L.) Koch, *B. juncea* (L.) Czernohorsky y *Sinapis alba* L. Muchas especies son importantes cultivos hortícolas, principalmente los derivados de *B. oleracea* L. (repollo, coles, repollitos de Bruselas, coliflor). Otras presentan un elevado valor potencial como recurso para cultivos con destino alimenticio, industrial, forrajero o para la producción de biodiesel (por ejemplo: *B. carinata* Braun, *Camelina sativa* [L.] Crantz, *Crambe abyssinica* [Fries] Prina, *Eruca vesicaria* [L.] Cav.) (Warwick, 2011).

Por otro lado, las brasicáceas también son conocidas por tener especies con un alto poder invasor, que interfieren en muchos cultivos de importancia económica. Se conocen más de 120 especies espontáneas, varias de ellas cosmopolitas, que se presentan en los sistemas productivos de todo el mundo. Entre ellas se encuentran *B. rapa* L., *Sinapis arvensis* L., *Thlaspi arvense* L., *Diplotaxis tenuifolia* [L.] DC. (Pandolfo, 2016). Algunas de estas especies tienen

su origen en ambientes cultivados, y no se las ha encontrado en estado silvestre en ningún momento previo de su evolución. En cambio, algunas especies silvestres fueron adaptándose a ambientes modificados por el hombre, sin ser cultivadas, aprovechando los hábitats favorables creados para el cultivo y manteniendo estrechas relaciones con las especies mejoradas, intercambiando material genético y compitiendo por los recursos (Gómez-Campo & Prakash, 1999). La flora natural de la República Argentina contiene 68 géneros de la familia Brassicaceae, incluyendo *B. rapa* (nabo) y *Raphanus sativus* (nabón), que son malezas invasoras en más de veinte provincias (Marzocca *et al.*, 1976; Martínez-Laborde, 1999).

Las brassicáceas presentan una arquitectura floral uniforme y altamente conservada en la mayoría de sus miembros, que permite distinguirla fácilmente de cualquier otra familia. Las flores presentan simetría bilateral y cuentan en general con cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres tetradínamos y un ovario bicarpelar. Por el contrario, los frutos exhiben una enorme variabilidad interespecífica, siendo el carácter más importante en las clasificaciones taxonómicas clásicas. La estructura básica de los frutos consiste en una cápsula bivalvada, dividida longitudinalmente por un falso tabique en dos lóculos, generalmente dehiscentes. Sobre la base de la relación largo/ancho, los frutos son clasificados en silicuas y silículas, aunque esta división no tiene ninguna implicancia filogenética (Lysak & Koch, 2011) (Figura 1.1).



Figura 1.1. Estructuras de *Brassica napus* L. A: flor; B: inflorescencia; C: pétalo; D: silicua; E: hoja expandida; F: semillas; G: campo de colza.

Las poblaciones de brassicáceas se encuentran ampliamente distribuídas en la región Pampeana, en ambientes aptos para el cultivo de *B. napus*. Extensas poblaciones de brassicáceas

espontáneas fueron halladas en todo el centro-sur de la provincia de Buenos Aires (Pandolfo, 2016). Esta zona es coincidente con el área de mayor difusión del cultivo de colza, ya que, en la provincia de Buenos Aires se cultiva aproximadamente el 50% de la superficie total nacional de colza (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina, 2023).

Muchas especies de brasicáceas, cultivadas y silvestres han sido mencionadas como fuentes de polen y néctar (Crane, 1984; Pierre, 2001; Andrada & Tellería, 2005). Es decir, que su presencia representa fuentes de alimento para un gran número de polinizadores y visitantes florales. Las abejas y las brasicáceas han coevolucionado durante su historia; por un lado, las abejas obtienen néctar y polen, y por el otro, las plantas reciben el servicio de polinización (Palmer, 1959, citado de Abrol 2007). Müller (1883) afirmó que la posición de las anteras en relación con los nectarios y el estigma, hace que la fertilización cruzada sea probable durante la visita de los insectos polinizadores. La flor está constituida de tal manera que es más probable que el polen transportado desde otra flor llegue al estigma antes que el propio. Para obtener el néctar, normalmente las abejas introducen la cabeza dentro de la flor; es en ese momento que su cuerpo piloso se frota contra las anteras que contienen el polen. Al volar a la siguiente flor, parte del polen transportado desde la flor anterior, queda adherido sobre el estigma. A medida que las abejas se mueven de planta en planta, producen polinización cruzada.

La floración de la colza comienza con la apertura del pimpollo basal del tallo principal y continúa hacia arriba con la apertura de tres o más flores por día. Dos o tres días después de que la primera flor abrió en el tallo principal, abre el pimpollo basal de la primera rama secundaria. En condiciones de crecimiento razonables, la floración del tallo principal dura habitualmente dos a tres semanas. Las flores comienzan a abrir temprano en la mañana y, cuando el proceso se completa, el polen es dispersado tanto por el viento (Williams, 1984; Cresswell *et al.*, 2004) como por los insectos. Las flores permanecen receptivas hasta tres días después de la apertura. Si el clima es favorable, cálido y seco, casi todo el polen será liberado durante el primer día. Por la noche, la flor se cierra parcialmente y abre de nuevo a la mañana siguiente. Normalmente, la fecundación se produce hasta 24 horas después de la polinización. Luego, la flor permanece cerrada y los pétalos se marchitan y caen. Un día más tarde, un fruto (silicua) joven se hace visible en el centro de la flor. Durante la floración, las ramas siguen creciendo a medida que los pimpollos se abren y las flores se desarrollan en frutos. De esta manera, las primeras silicuas también se encuentran en la parte más baja del tallo (principal o secundario) (Canola Council of Canada, 2023).

El género *Brassica* L. resulta atractivo para abejas y muchos otros visitantes florales. Todos ellos influyen en la polinización, siendo las abejas las que registran mayor cantidad de granos de polen sobre su cuerpo (Williams, 1985). Los azúcares presentes en el néctar proporcionan los carbohidratos necesarios para que la abeja pueda generar la energía para sus actividades, como volar. Por su parte, el polen es vital para desarrollar los tejidos musculares, glandulares y esqueléticos, ya que es la principal fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. La preservación de los insectos polinizadores, incluyendo a la abeja melífera, es desde hace ya tiempo una preocupación muy seria a nivel mundial (Le Féon, 2011).

La apicultura es una actividad que, más allá de la producción de miel, brinda un importantísimo servicio a toda la comunidad a través del servicio de polinización y, por ello, es importante para la sustentabilidad de los agroecosistemas. Argentina es uno de los principales productores y exportadores de miel del mundo con más de 3 millones de colmenas registradas (Ministerio de Economía, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2023). El ingreso más importante de la mayoría de los apicultores argentinos es la producción de miel, mientras que para los norteamericanos es el servicio de polinización. La miel se puede importar; no así el servicio de polinización. Para algunos productores agrícolas de países desarrollados, la polinización está entre los principales gastos o inversiones dentro de su estructura de costos. En Estados Unidos, se llegan a pagar hasta 200-220 USD por colmena para la polinización del almendro y sólo para la floración de ese cultivo se movilizan aproximadamente dos millones de colmenas (Goodrich, 2019). Este país tiene una superficie mucho mayor de cultivos dependientes de polinizadores y una mayor necesidad de colmenas para brindar este servicio. La situación en la Argentina es diferente; se observan cambios graduales en los últimos años y algunos apicultores están empezando a generar gran parte de sus ingresos por servicios de polinización.

En cuanto a los servicios de polinización a través de la abeja melífera, en general se exige a los apicultores el cumplimiento de reglas muy estrictas. En cultivos de semilla híbrida, es indispensable conocer el movimiento previo de las colmenas para evitar posibles contaminaciones con polen indeseable. La calidad de las colmenas es fundamental. Lo que interesa no es la cantidad de cajones o “alzas” por hectárea de cultivo, sino el número de abejas que polinizan las flores. El tamaño de la colonia se relaciona directamente con el precio del servicio, el cual es acordado entre el productor agrícola y el apicultor. A mayor tamaño de colmena, el precio debería aumentar debido a que los costos son más elevados en la preparación y en los fletes.

La alta dependencia de la polinización entomófila en cultivos como manzanas, peras y almendras muchas veces reside en la autoincompatibilidad (Socias i Company, 1998; Klein *et al.*, 2007; Garibaldi, 2012). Aun así, recientemente se comprobó que el porcentaje de cuajado aumentó un 60% en variedades de almendras autocompatibles polinizadas por abejas, y el rendimiento mejoró en un 20% (Sáez *et al.*, 2020). En otros cultivos como la frutilla, con baja presencia de polinizadores puede haber hasta un 30% de descarte por malformación de frutos, porque no llega suficiente cantidad de polen para que la flor se transforme en un fruto de buena calidad (Andersson *et al.*, 2012). Las interacciones entre las abejas melíferas y los polinizadores silvestres impactan positivamente la eficiencia de la polinización (Greenleaf & Kremen, 2006; Garibaldi *et al.*, 2014). Es decir que la biodiversidad de polinizadores y visitantes florales y el conocimiento de estas interacciones podría llevar a mayor eficiencia de polinización, aumentando los rendimientos del cultivo y disminuyendo gastos en los servicios de polinización.

El objetivo general de este trabajo es evaluar el cultivo de colza, así como la vegetación espontánea de la misma familia (Brassicaceae), como fuentes de alimentación para los visitantes florales, las propias poblaciones de visitantes y las relaciones entre estas variables y los componentes del rendimiento de colza. Se abordan también dos temas de importancia relativos a la polinización, de los que no se encontraron reportes previos: el periodo en que permanecen viables los granos de polen de colza dentro de las colmenas y la carga polínica que transportan en sus cuerpos los insectos que visitan la colza en el centro-sur bonaerense.

Hipótesis

- Numerosas especies de insectos visitan el cultivo de colza en el centro sur bonaerense.
- Las especies espontáneas, cuyos períodos de floración son más largos y/o diferentes de los cultivos de la misma familia botánica, sirven de fuentes de alimentación para los visitantes florales del cultivo.
- Los principales visitantes florales del cultivo de colza en el centro sur bonaerense trasladan polen sobre el cuerpo y actúan como polinizadores del cultivo.
- La presencia de insectos polinizadores contribuye, mediante el servicio de polinización, al rendimiento y la calidad del cultivo de colza.
- Dentro de una colmena de *Apis mellifera*, el polen de colza conserva su capacidad de germinar por un tiempo limitado.

Objetivos

- Identificar los distintos grupos de visitantes florales que intervienen en la polinización del cultivo de colza en el centro sur bonaerense.
- Identificar los insectos que visitan tanto el cultivo como las cercanías del mismo ocupadas por vegetación espontánea de las brasicáceas más abundantes en la zona de estudio.
- Determinar el efecto de los polinizadores sobre el rendimiento y sus componentes, en cultivares de colza utilizados comúnmente en el centro sur de la provincia de Buenos Aires. Demostrar que la actividad de polinizadores aumenta el contenido de aceite en el cultivo de colza.
- Determinar si el tamaño de los principales visitantes florales de colza influye en el número de granos de polen que transportan adheridos en el cuerpo.
- Establecer cuánto tiempo el polen de colza puede permanecer dentro de la colmena de *Apis mellifera* sin perder su capacidad de germinación.

Capítulo 2: Visitantes florales en el cultivo de colza en el centro sur bonaerense

Introducción

Las plantas fanerógamas y los insectos constituyen uno de los principales motores de biodiversidad de la tierra (Simón Porcar *et al.*, 2014), sus interacciones son una parte fundamental del funcionamiento de la vida que conocemos (Golubov & Mandujano, 2009). La importancia de los polinizadores en los ecosistemas naturales y en los agroecosistemas los ha convertido en objeto de numerosas investigaciones científicas. A pesar de que los insectos son, sin duda, los principales agentes polinizadores, no todos cumplen ese rol cuando visitan las flores; por lo tanto, en este trabajo, nos referiremos a los ejemplares muestreados como visitantes florales (Kevan, 2008). Cuando las condiciones ambientales se presentan favorables para su actividad, se puede encontrar gran variedad de especies visitando las flores. Sin embargo, la diversidad de plantas e insectos se encuentra en disminución debido a la actividad antrópica, que modificó el 50 % de la superficie terrestre en los últimos 300 años (Ellis *et al.*, 2010). Según Potts *et al.* (2010), la pérdida de polinizadores afectará no sólo a las plantas silvestres, sino también a los cultivos.

Debido a las diferencias en los rasgos funcionales de las especies, una mayor riqueza de polinizadores puede conducir a la complementariedad o sinergia durante el pecoreo, mejorando la cantidad y calidad de los granos de polen que se depositan en las flores (Blüthgen & Klein, 2011) y, por lo tanto, aumentar tanto la proporción de flores que dan frutos (o semillas) como la calidad del producto (por ejemplo, tamaño y forma de los frutos) (Garibaldi *et al.*, 2013). La diversidad morfológica de los polinizadores también puede favorecer la polinización de los cultivos. Insectos con proboscis relativamente corta pueden ser buenos polinizadores de cultivos con fácil acceso a las recompensas florales, por ejemplo, la colza. Otros cultivos, como es el caso del trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), necesitan polinizadores de proboscis larga, ya que sin ella no pueden acceder a los nectarios en la base de la corola tubular. En un cultivo de rábano (Brassicaceae), Albrecht *et al.* (2012) mostró que diferentes abejas, tanto sociales como solitarias, visitaron las flores en diferentes horas del día, sugiriendo la complementariedad temporal entre estos grupos de polinizadores.

Las flores de colza, *Brassica napus* L., presentan varios tipos de recompensas florales. Entre ellas se destacan el polen, de alta calidad nutricional, y el néctar, secretado en gran cantidad

(Williams, 1980; Cook *et al.*, 2017; Ouvrard *et al.*, 2017; Xun *et al.*, 2020) . Esto hace que las flores sean atractivas para muchos grupos de insectos antófilos. Entre los diferentes visitantes florales se encuentran los coleópteros, lepidópteros y dípteros; pero, sin dudas, los insectos que más se destacan debido a su importancia como polinizadores son los himenópteros. Dentro de este grupo, las abejas son consideradas las principales polinizadoras de cultivos debido a su abundancia en relación con otros polinizadores (Adegas & Nogueira-Couto, 1992; Williams, 2002; Witter *et al.*, 2014). La denominación “abeja” comprende a todos los integrantes de la superfamilia Apoidea, calculados en más de 20000 especies (Delaplane & Mayer, 2000; Abrahamovich *et al.*, 2007). En Argentina, se han identificado cerca de 1100 especies de abejas (Roig Alsina, 2008).

Los artrópodos benéficos comprenden una gran diversidad de taxones e historias de vida y los métodos disponibles para su muestreo son también muy diversos (McCravy, 2018). Las diferencias entre los cultivos, las zonas adyacentes y los distintos grupos de visitantes florales hace que el monitoreo sea muy complejo. Según Portman *et al.* (2020), en la actualidad aún no existe un esquema de monitoreo efectivo para las aproximadamente 4000 especies nativas en los Estados Unidos. En algunos estudios de abejas silvestres, su diversidad predice la producción de cultivos mejor que su abundancia (Garibaldi *et al.*, 2014). Un mejor conocimiento de los visitantes florales y sus interacciones podría aumentar la eficiencia de polinización, favorecer la biodiversidad, aumentar los rendimientos del cultivo y disminuir costos en los servicios de polinización.

Los métodos más comunes para el muestreo de insectos se pueden clasificar en activos y pasivos (Potts *et al.*, 2005; Westphal *et al.*, 2008). Dentro de los métodos activos, se encuentran la observación visual directa, el uso de red entomológica y el uso de aspiradores (Kearns & Inouye, 1993; Potts *et al.*, 2005; Droege, 2015). Entre los métodos pasivos están las trampas Malaise, de agua, de cebo, pegajosas (Kearns & Inouye, 1993; Dafni *et al.*, 2005; Droege, 2015), nidos trampa (Oliveira *et al.*, 2012), etc. La elección del método a aplicar dependerá del tipo de estudio que se pretenda realizar o del tipo de insectos que se desee coleccionar. Se ha comprobado que el uso de trampas de agua de colores (“pan traps” o “bowl traps”) es un método eficiente, imparcial y con una mejor relación costo-beneficio que otros (Droege, 2015; Gonzalez *et al.*, 2020). Grundel *et al.* (2011) y McCravy (2018) señalan que la utilización de red entomológica como método adicional de colecta ayuda a complementar los inventarios biológicos.

Las trampas y el muestreo con redes son métodos comúnmente empleados para el monitoreo de polinizadores, cada uno con ventajas y desventajas (McCravy, 2018; Thompson *et al.*, 2021). Las trampas de agua representan un método simple y rápido para capturar insectos voladores aprovechando el atractivo de colores específicos. A pesar de esto, el tamaño de los visitantes florales y el color de la trampa puede influir en la eficacia de los muestreos (Krahner *et al.*, 2021). El uso de trampas de agua puede ser particularmente beneficioso en cultivos de campo con floraciones densas, como las semillas oleaginosas, donde la visibilidad reducida puede presentar una restricción en el registro preciso de pequeños visitantes florales (Garratt *et al.*, 2019). Las especies recolectadas no siempre son polinizadores y, en el caso de los insectos que visitan las flores, este método no registrará su importancia como polinizadores (Roulston *et al.*, 2007; Tuell & Isaacs, 2009; Gonçalves & Oliveira, 2013; Popic *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2015).

El muestreo con red y la observación directa, en los que se identifican a los insectos en las flores, ofrecen la oportunidad de obtener información sobre las interacciones entre insectos y plantas y la potencial polinización. Sin embargo, estos métodos suelen requerir más mano de obra en comparación con las trampas, que pueden tomar muestras durante días o semanas. Además, pueden tener diferentes sesgos hacia los tipos de insectos que se recolectan. Las trampas capturan insectos que tienen más probabilidades de ser atraídos o que caen accidentalmente. El muestreo con red atrapa insectos que el recolector puede detectar. Las especies más grandes, ruidosas y llamativas son fáciles de observar en los muestreos con red y observación directa, y pueden ser más difíciles de capturar con las trampas de agua (Thompson *et al.*, 2021).

Si bien la colza puede considerarse una especie autocompatible, existe evidencia de que la polinización entomófila mejora su rendimiento (Sabbahi *et al.*, 2005; Morandin & Winston, 2006; Bommarco *et al.*, 2012). De lo expuesto anteriormente, se desprende la importancia de la interacción colza-polinizadores. El objetivo de este capítulo es identificar los distintos grupos de visitantes florales que intervienen en la polinización del cultivo de colza en el centro sur bonaerense.

Materiales y métodos

Visitantes florales de colza capturados en trampas de agua

La presencia de visitantes florales de colza, *Brassica napus*, en el centro sur bonaerense fue evaluada durante 2015 en parcelas ubicadas en la localidad de Tres Arroyos, en la Chacra Experimental Integrada Barrow (-38.319305, -60.239380) (Figura 2.1). A 200 m de las parcelas se colocó un apiario de cuatro colmenas.

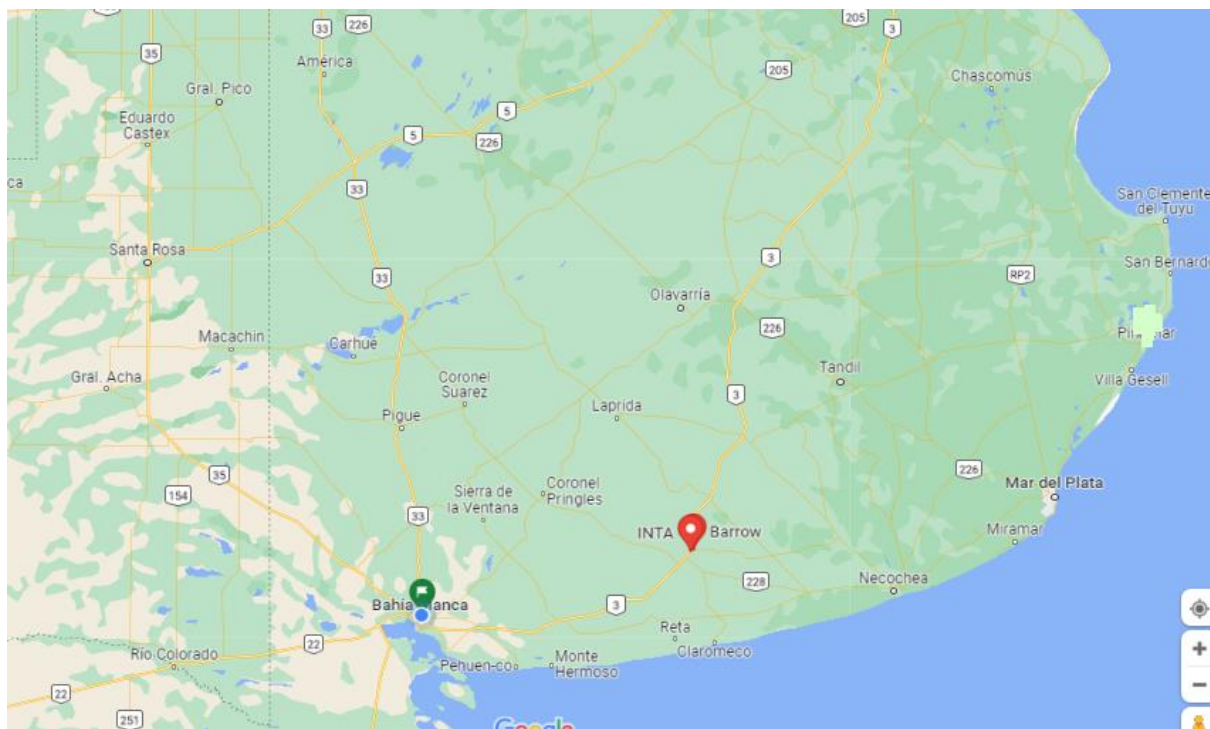


Figura 2.1: Ubicación del Departamento de Agronomía UNS (marcador verde) y los sitios de muestreo en la Chacra Experimental Integrada Barrow (marcador rojo).

En el ensayo se utilizaron tres cultivares: Hyola 433, Larissa y Bioaureo 2486. La siembra se realizó el 3 de junio del 2015 en parcelas de 2.56 m de ancho por 6 m de largo, con una sembradora a chorrillo. Cada parcela tenía un total de 8 líneas de siembra y la distancia entre líneas fue de 0.32 m. El diseño experimental fue en bloques al azar con tres repeticiones. Cada bloque presentó en sus laterales cuatro líneas de la variedad Bioaureo, para minimizar el “efecto borde” sobre las parcelas de estudio.

Previo a la siembra, se fertilizó con fosfato diamónico a una dosis de 80 kg ha⁻¹ y se incorporó trifluralina a una dosis de 1.5 l ha⁻¹ para controlar las malezas. Un análisis de suelo al momento de la siembra mostró que presentaba 3.7 % de materia orgánica y un pH igual a cinco. El

resultado del análisis reportó 36.9 ppm de fósforo, 115.6 mg/kg de nitratos y 12.1 ppm de sulfato. Cuando las plantas se encontraban en estado de roseta (4 hojas) se realizó una fertilización de 190 kg ha⁻¹ de urea y 95 kg ha⁻¹ de sulfato de amonio. En ese mismo estado se aplicaron 90 cc ha⁻¹ de Dicamba (Banvel®) junto con 250 cc ha⁻¹ Clopyralid (Lontrel®) para controlar las malezas de hoja ancha y 500 cc ha⁻¹ de Cletodim (Select®) para controlar las de hoja angosta.

Para capturar los visitantes florales se utilizaron tanto redes entomológicas como trampas de agua de colores (Toler *et al.*, 2005; LeBuhn *et al.*, 2012; FAO, 2016; Buffington *et al.*, 2021). Las trampas de agua se colocaron durante el periodo de floración, y consistieron en vasos de plástico de 180 ml que se colocaron dentro de cada parcela a la altura de las inflorescencias (1.5 m aprox.) (Figura 2.2A). Los vasos plásticos se sujetaron a varillas de hierro torsionado de 8 mm con un adaptador *ad hoc* que permitía regular su altura. A cada recipiente se le agregó aproximadamente 90 ml de agua con escamas de jabón blanco para romper la tensión superficial. En cada parcela se colocaron tres trampas, una blanca, una celeste y una amarilla, alineadas en el centro, y se aleatorizó la posición de los colores (Figura 2.3 A). Las trampas se activaron semanalmente, durante seis semanas, a las 11:00 h (-3 GMT) de la mañana y se recolectaron a la misma hora del día siguiente. Las muestras de insectos obtenidas a lo largo de 24 h fueron etiquetadas y conservadas en etanol al 70% (Figura 2.2B).

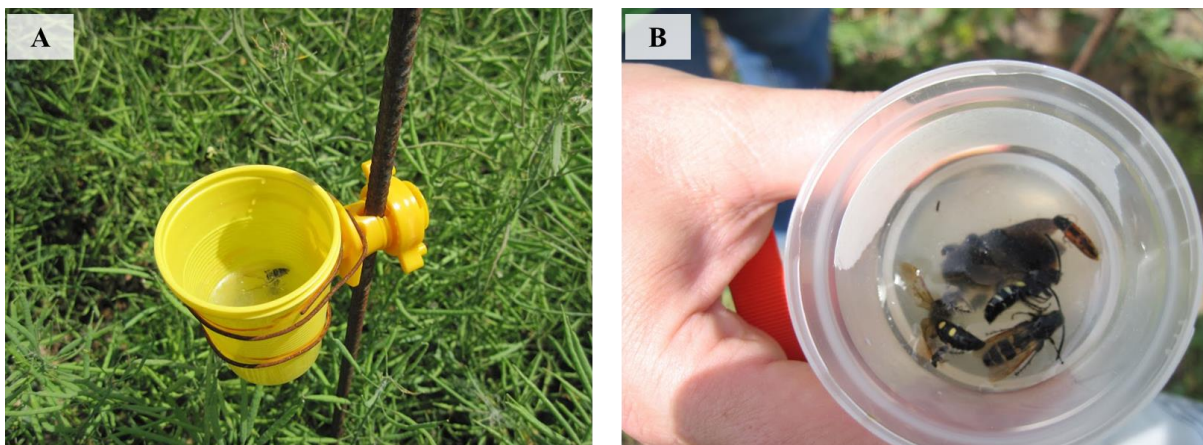


Figura 2.2: A: Trampa de agua amarilla en parcela de colza finalizando la floración. B: Recipiente con una muestra de las trampas de agua para su traslado al laboratorio.

Se contabilizaron los ejemplares correspondientes a los órdenes de visitantes florales: Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Homoptera, Thysanoptera, Lepidoptera y Heteroptera, mencionados en la bibliografía como los más relevantes (Proctor & Yeo, 1973; Barth, 1991). El recuento se enfocó en los himenópteros, dada su importancia como polinizadores, discriminando los individuos pertenecientes a las superfamilias Apoidea y Vespoidea (Ollerton

et al., 2012). Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Los datos de recuento de insectos fueron transformados a su logaritmo natural (\ln), se corroboró la homocedasticidad y normalidad y fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias de Bonferroni.

Las capturas con redes entomológicas se realizaron específicamente para corroborar en el laboratorio las identificaciones hechas a campo sobre las flores del cultivo (Figura 2.3 B). Los insectos se colocaron en un recipiente etiquetado y se trasladaron al laboratorio. Las identificaciones se llevaron a cabo utilizando lupas estereoscópicas y claves entomológicas (Michener *et al.*, 1994; Michener, 2007; Roig-Juñent *et al.*, 2014), además de consultar con dos especialistas, el Dr. Arturo Roig Alsina y la Dra. Rocío González Vaquero, del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. La identificación se realizó a nivel de orden y familia, y cuando fue posible, a nivel de género y especie, o bien, de morfoespecie. Este último término se aplica cuando se detectan y delimitan unidades taxonómicas reconocibles que resultan del análisis y comparación de caracteres morfológicos fácilmente observables y no se puede identificar de forma precisa el nivel de género y especie (Mendoza Arroyo *et al.*, 2011; Guzman Jacob, 2013; Fuentes, 2015).

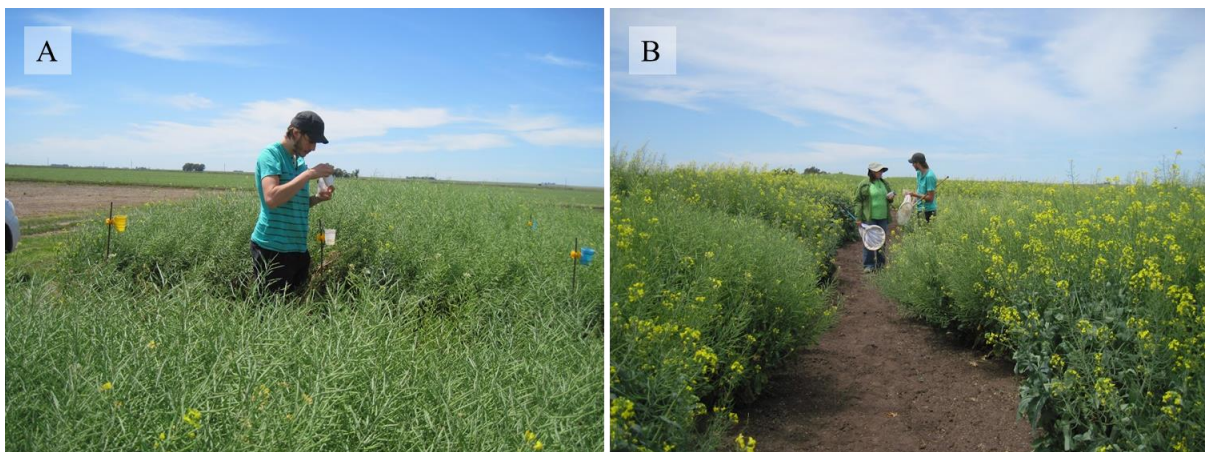


Figura 2.3: A: Trampas de agua de color blanco, celeste, y amarillo para capturar los visitantes florales en parcelas de colza. B: Capturas de visitantes florales con redes entomológicas en parcelas de colza, en la Chacra Experimental Integrada Barrow.

Número de visitas de insectos observados en flores de colza

Las visitas en el cultivo de colza en el centro sur bonaerense fueron cuantificadas durante los años 2016 y 2017 en parcelas ubicadas en la localidad de Tres Arroyos, en la Chacra Experimental Integrada Barrow (-38.319305, -60.239380). En 2016 se utilizaron los cultivares

Hyola 575 y Nuvette 2286 y en 2017, Hyola 433 y Bioaureo 2486. Los cultivares se sembraron en parcelas de 1.75 m x 6 m y a 200 m se colocó un apiario de cuatro colmenas. El diseño experimental en ambos años de ensayos fue en bloques al azar con tres repeticiones y dos réplicas por bloque.

Se tomó como criterio de “visita” que el insecto ingresara a la parcela y presentara algún tipo de actividad sobre una o varias flores. En el caso que un mismo polinizador, luego de visitar la flor abandonara la parcela y volviera a ingresar, se contabilizó como una nueva visita. Se distinguieron dos categorías: abeja melífera y otros insectos.

La temperatura durante la floración del cultivo se caracterizó por ser baja durante la noche, las primeras horas de la mañana y las últimas de la tarde. Temperaturas entre 20-25°C favorecen el vuelo de las abejas, aumentando el número de flores polinizadas (Fischer *et al.*, 2009). Las temperaturas medias mínimas registradas fueron: en octubre 2016, 8.6 °C; noviembre 2016, 9.7 °C; octubre 2017, 7.6 °C; noviembre 2017, 9.7 °C. Durante el día, la temperatura generalmente aumenta mejorando las condiciones para el vuelo de los polinizadores (Benedek, 1972; Abrol, 1988), habiéndose registrado las siguientes temperaturas medias máximas: octubre 2016, 20.9 °C; noviembre 2016, 26.1 °C; octubre 2017, 20.9 °C; noviembre 2017, 22.7 °C. Debido a estas variaciones en la temperatura se realizaron observaciones preliminares para establecer el periodo en el que los visitantes florales se encontraban pecoreando las flores de colza.

Para realizar los conteos, se colocaron sobre el cultivo, de forma aleatoria, ocho aros de 0.25 m² y se contabilizó durante 10 minutos el número de visitantes que ingresaban (Figura 2.4). Esto se realizó semanalmente durante las cuatro semanas de floración del cultivo y se repitió 3 veces al día. El primer horario de muestreo fue a las 10 h, el segundo a las 13 h y el último a las 16 h (-3 GMT).



Figura 2.4: Medición de visitas en parcelas de colza ubicadas en la Chacra Experimental Integrada Barrow.

Resultados y discusión

Visitantes florales de colza capturados en trampas de agua

En total se capturaron y clasificaron 909 insectos de los cuales el 71.73 % perteneció al orden Hymenoptera, que fue el más representado. Los siguientes en abundancia fueron Coleoptera, con un 12.87 %, y Homoptera con 12.65 %. Los órdenes Hemiptera, Diptera y Lepidoptera fueron los menos representados con valores por debajo del 2 % (Figura 2.5). El ensayo no reveló diferencias significativas entre cultivares de colza, lo cual indica que todos atrajeron similar cantidad de visitantes florales ($p > 0.05$).

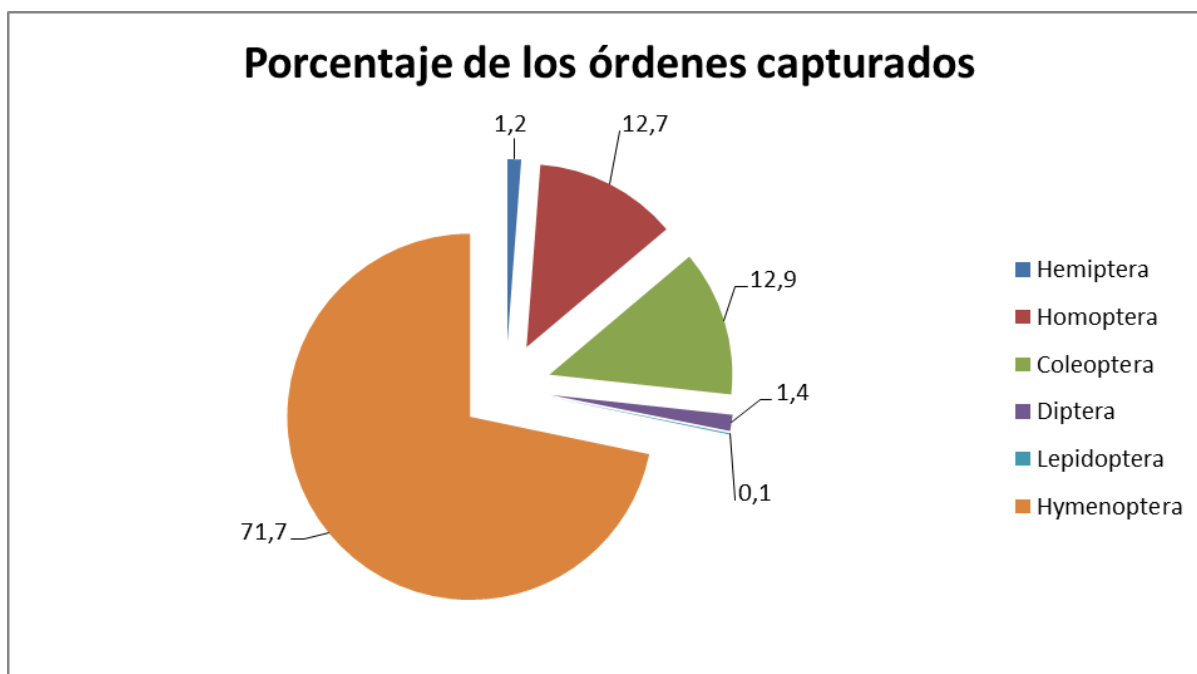


Figura 2.5: Porcentaje de los órdenes de insectos capturados con trampas de agua en un cultivo de colza en el centro sur de la provincia de Buenos Aires.

En su trabajo sobre la efectividad de los polinizadores de colza, Phillips *et al.* (2018) indican que “los individuos más grandes son los que tienen posibilidad de contactar mayor superficie del estigma y, en este tipo de flores, más posibilidades de contactar a la vez el estigma y los estambres, lo cual implica una mayor transferencia de polen”. Tomando en cuenta este criterio y el hecho de que los homópteros encontrados eran mayoritariamente pulgones, que no poseen estructuras especializadas para la polinización y de hábitos sedentarios, se decidió considerar para el estudio estadístico los insectos de tamaño superior a 2 mm. Aplicando este nuevo criterio, los órdenes más importantes fueron himenópteros, coleópteros, dípteros y lepidópteros.

La temperatura y nubosidad son factores ambientales que afectan la apertura floral, así como la presencia y abundancia de insectos (Fischer *et al.*, 2009; Bajiya & Abrol, 2017). Al igual que lo obtenido por Bajiya & Abrol (2017), las jornadas de mayor temperatura, más heliofanía y menos viento fueron las que registraron mayores capturas en este trabajo/ensayo. El color de las trampas también influyó sobre el tipo y el número de visitantes florales capturados. Es decir, que algunos órdenes estuvieron más representados en un color de trampa. Las celestes presentaron mayor cantidad de capturas a lo largo de toda la floración del cultivo y se diferenciaron estadísticamente ($p < 0.05$) de las amarillas que fueron las de menor captura. Las

trampas blancas mostraron valores intermedios, pero no se diferenciaron de las otras ($p > 0.05$) (Figura 2.6).

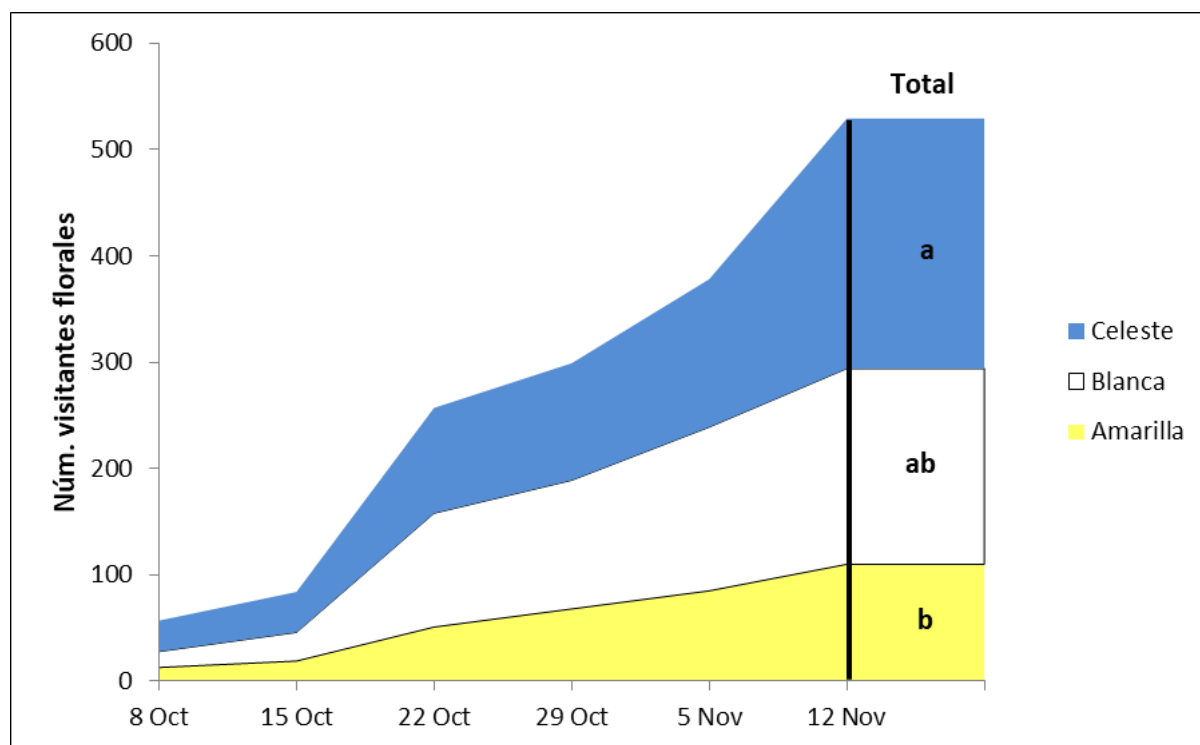


Figura 2.6: Número de visitantes florales de colza capturados en los diferentes colores de trampas de agua en el 2015. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

El orden Hymenoptera fue el más representado y se diferenció estadísticamente de los otros órdenes ($p < 0.05$). Al igual que ensayos previos (Marinozzi *et al.*, 2018), las trampas blancas y celestes capturaron la mayor cantidad de himenópteros y no hubo diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). Las amarillas presentaron menor cantidad de himenópteros y se diferenciaron de las celestes ($p < 0.05$), pero no de las blancas ($p > 0.05$).

Para el orden Coleóptera, las trampas celestes y blancas también capturaron mayor cantidad de ejemplares que las amarillas. A pesar de que en este ensayo las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estudios anteriores (Marinozzi *et al.*, 2018). En el caso de los dípteros y lepidópteros los resultados no fueron consistentes. El bajo número de capturas no permitió determinar los colores de trampa más convenientes.

Influencia del color de trampa para los himenópteros

El rol de los himenópteros, particularmente de la superfamilia Apoidea, en la polinización de las plantas con flores (Kevan & Baker, 1983) es de gran importancia; por lo que se consideró

relevante estudiar el color de las trampas en relación con este grupo de insectos. El orden Hymenoptera estuvo representado en un 69 % por abejas (superfamilia Apoidea) y un 31 % por avispas (superfamilia Vespoidea y Sphecoidea). Entre los Hymenoptera se hallan muchas especies solitarias, pero también hay unas cuantas de hábitos sociales. En este trabajo, el grupo de himenópteros sociales estuvo compuesto mayoritariamente por la especie *Apis mellifera* L. También se capturaron individuos de avispas camoatí, *Polybia scutellaris* (White). El 43 % de las capturas de abejas sociales se obtuvo en las trampas amarillas, seguido de las blancas con un 33 % y, por último, las celestes con 24 % (Tabla 2.1A). No se obtuvieron diferencias estadísticas entre los colores de trampa ($p > 0.05$), es decir no se registró que un color fuera más eficiente que otro en la captura de himenópteros sociales. Estos resultados no se condicen con los de Sircom *et al.* (2018), quienes obtuvieron mayores capturas en las trampas blancas y celestes, diferenciándose significativamente de las amarillas. Otros estudios (Tuell *et al.*, 2009; Gollan *et al.*, 2011; Rodríguez-Saona *et al.*, 2012; Heneberg & Bogusch, 2014; Moreira *et al.*, 2016) donde contabilizaron las capturas de la abeja melífera, concluyeron que estas prefirieron las trampas blancas sobre las amarillas.

A diferencia de las abejas sociales, los colores de trampas influyeron en las capturas de himenópteros solitarios. El 48 % de los ejemplares se hallaron en las trampas celestes, y junto con las blancas (36 %), fueron las que mayor número de visitantes florales presentaron. Ambos colores de trampa se diferenciaron de las amarillas que sólo capturaron un 15 % ($p < 0.05$). El mayor número de individuos estuvo representado por la morfoespecie Halictidae que fueron hallados principalmente en las trampas celestes (54 %) y blancas (29 %). Los ejemplares de *Campsomeris bistrimaculata* (Lepeletier) (Scoliidae), una avispa nativa con gran actividad en las flores del cultivo de colza, fueron capturados en mayor medida por las trampas blancas (47 %) y celestes (39 %). Para ambos grupos de visitantes las trampas amarillas presentaron los menores valores, cercanos a un 15 %. Las trampas celestes fueron las únicas que capturaron ejemplares de *Xylocopa augusti* (Latreille) (Apidae), los cuales estuvieron muy poco representados y las capturas se realizaron en la última fecha de muestreo (12 de noviembre) (Tabla 2.1B).

Dentro de la morfoespecie Halictidae se capturaron ejemplares pertenecientes a los géneros: *Dialictus*, *Augochloropsis*, *Pseudagapostemon*, *Ruizantheda* y *Halictillus*. En dos de los géneros se pudo llegar a nivel de especie para algunos ejemplares: *Halictillus amplilobus* y *Ruizantheda divaricata*. Estas identificaciones se realizaron gracias a la ayuda de la Dra. González Vaquero quien indicó que las hembras de las diferentes especies son difíciles de

diferenciar; especialmente cuando los ejemplares fueron capturados en trampas de agua donde su estado se deteriora, complicando el montaje y posterior identificación.

También se identificaron reinas de *Bombus bellicosus* Smith. Este género está representado también en Argentina por otras especies: *Bombus terrestris* L. y *Bombus ruderatus* Fab., que a diferencia de *B. bellicosus* son exóticas y han sido reportadas en el oeste de la Patagonia (Roig Alsina & Aizen, 1996; Torretta *et al.*, 2006). Los abejorros *B. terrestris* y *B. ruderatus* representan un problema en diferentes lugares del mundo en los que fueron introducidos, dado que se diseminaron y compiten por los recursos florales con los polinizadores nativos (Morales, 2007). En este estudio no se encontraron ejemplares de ninguna de estas dos especies invasoras ni de otras nativas pertenecientes al género *Bombus*.

Tabla 2.1: A) Preferencia por los colores de trampa, expresada en porcentaje, según el grado de sociabilidad de los himenópteros. B) Preferencia por los colores de trampa, expresada en porcentaje para los distintos grupos de himenópteros. Letras iguales dentro de una misma fila indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Preferencia de color de trampa	Celeste	Blanco	Amarillo
A: Sociabilidad	%	%	%
Sociales	23.46a	33.33a	43.21a
No sociales	48.39a	36.02a	15.59b
B: Taxa	%	%	%
<i>Apis mellifera</i>	19.74	35.53	44.74
Halictidae	54.08	29.18	16.74
<i>Xylocopa augusti</i>	100.00	0.00	0.00
<i>Campsomeris bistrimaculata</i>	38.85	47.48	13.67
Otras avispas	66.67	0.00	33.33

Según Toler *et al.* (2005), las trampas de agua podrían provocar una estimulación supernormal (Tinbergen & Perdeck, 1950) cuando son de color diferente a la floración del paisaje. En un principio se pensó que el bajo número de capturas de himenópteros no sociales en las trampas amarillas podría deberse al bajo contraste entre el color de la floración de colza y el de las trampas. Resultados similares obtuvieron Cane *et al.* (2000), quienes trabajaron con *Larrea tridentata* (Sessé & Moc. ex DC.) Coville (Zygophyllaceae) de floración amarilla. Otros autores (Geroff *et al.*, 2014; Sircom, 2018), también obtuvieron menor número de capturas en las trampas de este color a pesar de trabajar con flores de tonalidades contrastantes. En este trabajo, las trampas amarillas fueron las que capturaron mayor número de ejemplares de abejas sociales. Por lo tanto, el bajo contraste de color no necesariamente sería el responsable de este resultado.

Número de visitas de insectos observados en flores de colza

La mayor actividad de los visitantes florales de colza en el centro sur bonaerense fue entre las 10 y 16 h (-3 GMT). La abundancia de *Apis mellifera* fue significativamente mayor que el resto de los visitantes florales ($p < 0.05$), alcanzando el 90 % y 79 % del total de las visitas registradas en 2016 y 2017 respectivamente (Figura 2.7).

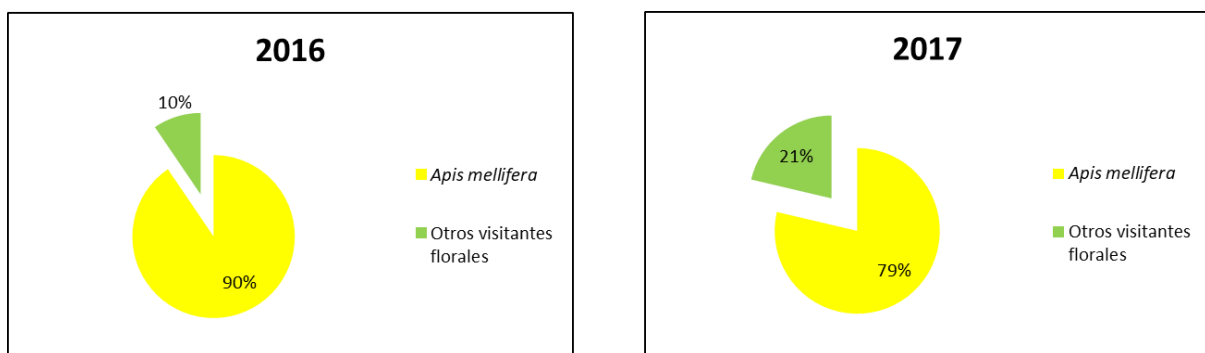


Figura 2.7: Porcentaje de *Apis mellifera* vs “otros visitantes florales” contabilizados con el método de visitas en un cultivo de colza en el centro sur de la provincia de Buenos Aires.

En los tres horarios de muestreo se registró una alta actividad de pecoreo de la abeja melífera en las flores de colza, resultando significativamente mayor ($p < 0.05$) a las 13 h en el primer año de muestreo. Las condiciones ambientales influyen notablemente en los horarios de vuelo como fue registrado por otros investigadores (Ali *et al.*, 2011). En el 2016 los visitantes florales nativos mostraron diferencias estadísticas en cuanto a la actividad de pecoreo, siendo las 10 h el horario con menor número de visitas ($p < 0.05$) (Figura 2.8). Esto no se repitió en 2017,

donde no hubo diferencias entre horarios para la abeja melífera ni para los insectos nativos (Figura 2.9).

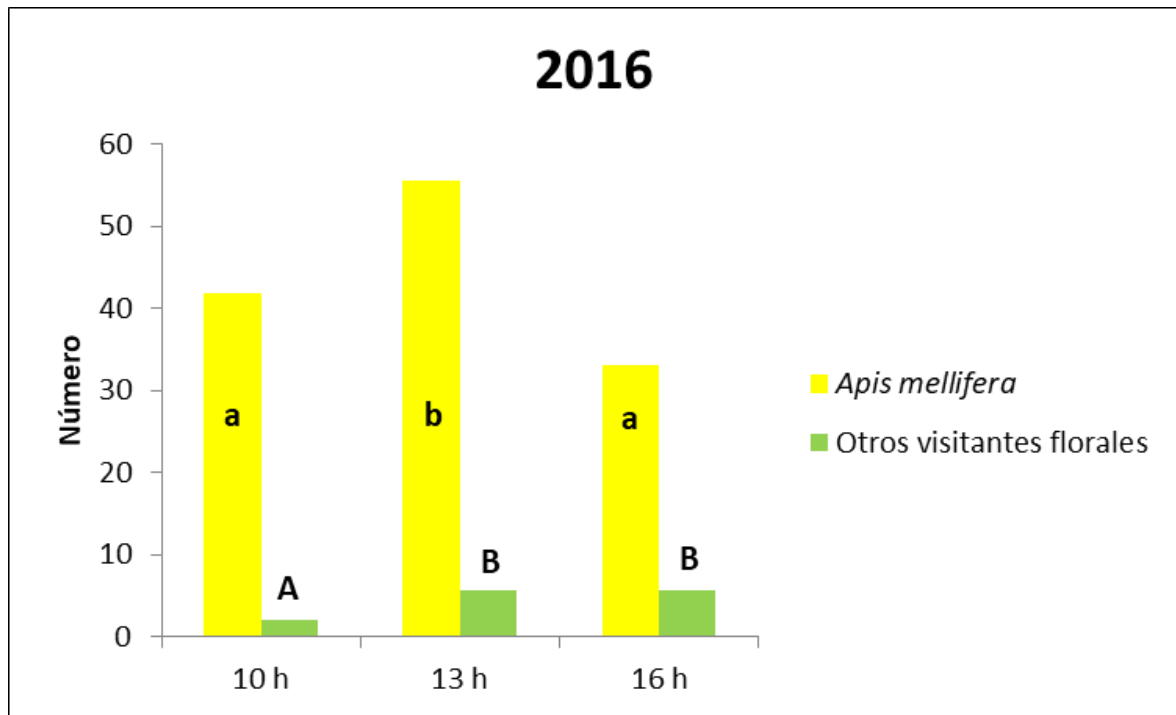


Figura 2.8: Número de ejemplares de *Apis mellifera* vs “otros visitantes florales” contabilizados con el método de visitas en diferentes horarios durante la floración de un cultivo de colza en el centro sur de la provincia de Buenos Aires en el año 2016. Letras minúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los horarios de muestreo para *Apis mellifera*. Letras mayúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre horarios de muestreo en los “otros visitantes florales”.

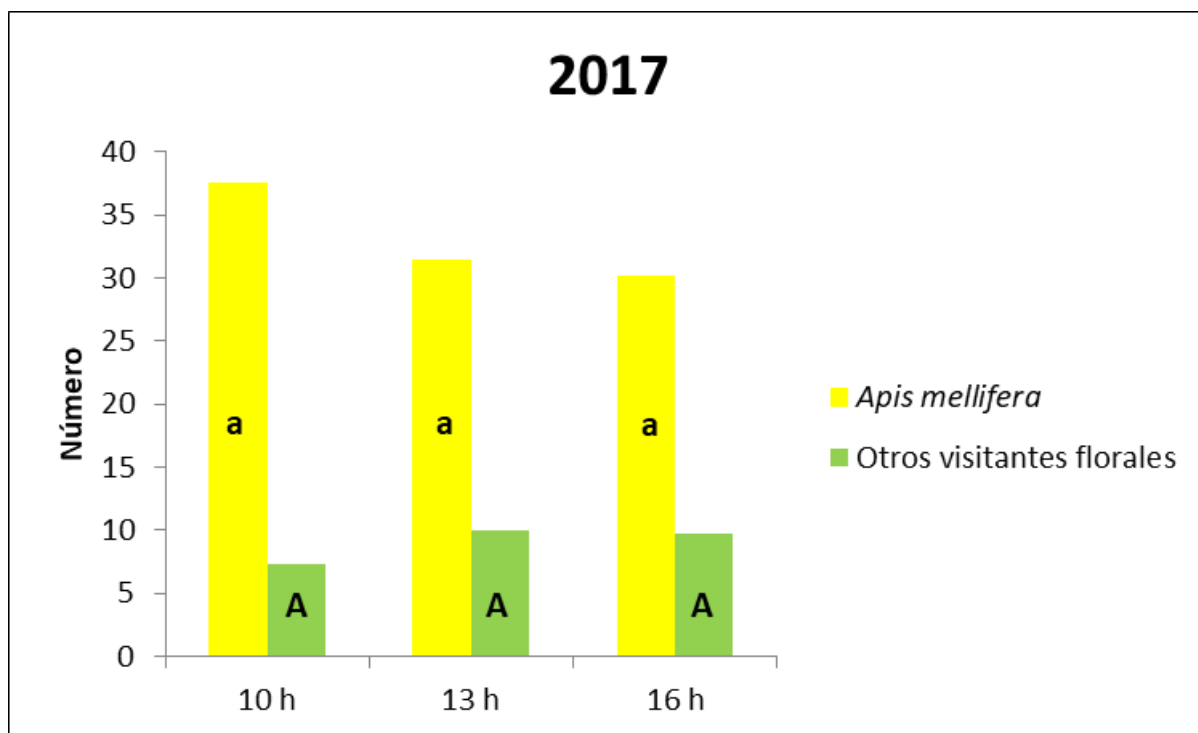


Figura 2.9: Número de ejemplares de *Apis mellifera* vs “otros visitantes florales” contabilizados con el método de visitas en diferentes horarios durante la floración de un cultivo de colza en el centro sur de la provincia de Buenos Aires en el año 2017. Letras minúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los horarios de muestreo para *Apis mellifera*. Letras mayúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas con $p < 0.05$ entre horarios de muestreo en los “otros visitantes florales”.

Aportes generados por los métodos de observación directa y trampas de agua

Las dos técnicas utilizadas para el relevamiento de visitantes florales proporcionaron diferente tipo de información.

El método de observación directa a través del conteo de visitas, permitió establecer el número de visitantes florales en los diferentes horarios de muestreo. Los ejemplares registrados presentaron actividad sobre las flores, lo que los muestra como potenciales polinizadores del cultivo. Este método permitió, además, observar un comportamiento diferente de *Campsomeris bistrimaculata* respecto a la abeja melífera, dado que se notaba una repentina baja en el número de *Campsomeris* en las flores de colza cuando el sol se ocultaba por la presencia de nubes. Esto no sucedía con las abejas.

El uso de trampas de agua permitió registrar mayor diversidad de visitantes florales de colza, ya que la mayoría de las especies capturadas no se registraron mediante la observación directa

de las visitas. Esto coincide con lo reportado por Prendergast *et al.* (2020), que describe los métodos de observación directa de visitantes florales como menos efectivos para distinguir entre niveles taxonómicos, respecto a las trampas.

En el sur bonaerense, la diversidad de abejas se compone mayormente por especies solitarias y, de acuerdo con Hutchinson *et al.* (2022), donde las comunidades de abejas están constituidas por gran cantidad de especies solitarias, las trampas de aguas presentan mejor desempeño que los métodos de observación directa. La eficiencia de las trampas de agua puede variar según los colores, por lo tanto, debería tomarse en cuenta la composición de la comunidad de polinizadores para la elección del color (Hutchinson *et al.*, 2022). En este ensayo se utilizaron tres colores (amarillo, blanco y celeste); aun así, el método de trampas de agua subestimó el número de capturas de la abeja melífera respecto a los registros de observación directa.

Conclusiones

Numerosas especies de insectos de diversas familias y órdenes visitaron el cultivo de colza en el centro sur bonaerense. Los himenópteros fueron el grupo más representado, comprendiendo numerosas especies de la superfamilia Apoidea. De las especies de himenópteros capturadas, la abeja melífera es la única especie introducida. A través del método de observación directa, se corroboró su intensa actividad pecoreadora tanto de néctar como de polen.

Aun cuando la zona de estudio está altamente modificada por la agricultura, presentó diversidad de especies nativas como *Campsomeris bistrimaculata*, *Bombus bellicosus*, halíctidos, *Xylocopa augusti*, *Colletes* sp., etc. La diversidad de especies es vital para, en un futuro y a través de prácticas de producción respetuosas del ambiente, aumentar el número de polinizadores nativos.

Capítulo 3: Diversidad y abundancia de visitantes florales en colza y brasicáceas espontáneas

Introducción

La alteración de hábitats y de poblaciones de especies nativas, la introducción de especies exóticas y el cambio climático conducen a la homogeneización de los paisajes y de las comunidades, afectando la disponibilidad de recursos para los diferentes grupos de insectos con importancia económica, como los polinizadores (Gómez-Martínez *et al.*, 2022). La intensificación agrícola plantea una grave amenaza para la biodiversidad (Hendrickx *et al.*, 2007). Las perturbaciones ambientales debidas a las prácticas realizadas en los cultivos afectan negativamente a las comunidades nativas de plantas y polinizadores. Las áreas remanentes de hábitat natural que favorecen el desarrollo de especies nativas, son cada vez menos numerosas, más pequeñas, aisladas entre sí y con una diversidad limitada de flores (Agüero *et al.*, 2018). El uso inadecuado de herbicidas perjudica claramente las fuentes de alimento de los polinizadores, generando estructuras paisajísticas homogéneas. Gómez-Martínez *et al.* (2022) encontraron mayor abundancia de polinizadores silvestres en áreas ricas en flores, y en paisajes heterogéneos. La diversidad de abejas silvestres está estrechamente relacionada con la riqueza floral, ya que los polinizadores dependen de estos recursos en todas sus etapas de vida y castas (Michener, 2007). Una agricultura más variada puede contribuir a mantener una mayor diversidad de polinizadores y, por lo tanto, servicios de polinización más eficientes y estables (Tscharntke *et al.*, 2005; Mandelik *et al.*, 2012; Garibaldi *et al.*, 2014, 2013; Blaauw & Isaacs, 2014; Aizen *et al.*, 2019). La pérdida y fragmentación de la naturaleza y de los hábitats seminaturales reducen la estabilidad espacial y temporal de la riqueza de visitantes florales y servicios de polinización en campos de cultivos (Garibaldi *et al.*, 2011; Sáez *et al.*, 2014; Kleijn *et al.*, 2015; Le Féon *et al.*, 2015; Agüero *et al.*, 2018). En consecuencia, la conservación de la biodiversidad en los agroecosistemas es un tema importante para aquellos cultivos que interactúan con los polinizadores, porque sin ellos tienden a tener rendimientos más bajos (Garibaldi *et al.*, 2013; Potts *et al.*, 2016).

En Europa, resulta preocupante el deterioro de la biodiversidad y algunas empresas sugieren siembra de especies nectaríferas y poliníferas en el margen de los cultivos (Canomanuel, 2011). Blaauw & Isaacs (2014) propone el uso de tierras marginales para cultivar flores silvestres que brinden recursos para favorecer a las abejas silvestres y mejorar la polinización en los cultivos

adyacentes. La creación de hábitats con diversidad floral se ha adoptado como el principal método para conservar y mejorar la abundancia y diversidad de abejas en los agroecosistemas (Carvell *et al.*, 2006; Winfree, 2010). Las especies espontáneas tienen un alto valor para los insectos benéficos, normalmente florecen antes, durante y después que los cultivos, ayudando así a la supervivencia de polinizadores y enemigos naturales (Altieri & Nicholls, 2004). En el siglo XX, la pérdida de recursos alimenticios como resultado de la intensificación agrícola fue la principal causa de las disminuciones en poblaciones de abejas (Roulston & Goodell, 2011; Carvalheiro *et al.*, 2013; Ollerton *et al.*, 2014; Scheper *et al.*, 2014).

Según Gómez-Martínez *et al.* (2022), los polinizadores silvestres tienen una alta plasticidad de pecoreo y amplían su dieta taxonómica y funcional a medida que aumenta la diversidad de flores en el paisaje, es decir, que se alimentan de más especies de plantas y con una mayor variedad de rasgos. Una mayor diversidad de recursos alimenticios implica más oportunidades para alimentarse de diferentes especies de plantas. A pesar de esto, los polinizadores son capaces de adaptar su dieta en ambientes con poca diversidad floral, pero esta situación podría dar lugar a deficiencia en la polinización y mayor proporción de especies generalistas (Gómez-Martínez *et al.*, 2022).

Según Morandin & Winston (2005) quienes trabajaron en colza, las áreas homogéneas perjudican a las poblaciones de abejas nativas y tienen menor potencial productivo que aquellas de mayor diversidad vegetal. Los cultivos de colza con áreas seminaturales cercanas tenían más abundancia de abejas que los campos totalmente rodeados por áreas cultivadas, y además el rendimiento fue mayor (Morandin *et al.*, 2007). La conservación de las áreas marginales cercanas a los cultivos se recomienda incluso en situaciones en las que las abejas melíferas dominan la comunidad de visitantes florales, ya que existe una mejora en la polinización cuando se encuentran abejas silvestres (Garibaldi *et al.*, 2013).

La colza se caracteriza por tener flores abiertas, donde el néctar y el polen se encuentran fácilmente disponibles para una amplia gama de insectos. Además, florece a principios de la primavera, cuando la disponibilidad de recursos generalmente es limitada. Según Wood *et al.* (2017), quien realizó estudios en Inglaterra, el polen del género *Brassica* es importante para las abejas solitarias especialmente en el comienzo de la primavera. Los cultivos de floración masiva, en particular la colza, se han asociado con mayores densidades de pecoreo abejorros, y un mayor número de colonias en entornos agrícolas, debido a una mayor disponibilidad de recursos durante el desarrollo temprano de las colonias (Westphal *et al.*, 2003; Herrmann *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2015). Según Le Féon *et al.* (2011), las especies de abejas que presentan

actividad temprana, desde principios de la primavera, utilizan abundantemente los recursos de la colza. Se ha demostrado la abundancia y riqueza de especies de abejas solitarias en los cultivos y el margen de campos con colza en relación con otros sembrados (Delbrassine & Rasmont, 1988; Calabuig, 2000; Le Féon *et al.*, 2011), pero se sabe poco con respecto a la influencia de la distribución espacial de abejas solitarias en el paisaje.

Se ha argumentado que mantener la diversidad de especies de polinizadores es crucial para proporcionar resiliencia a los ecosistemas frente a futuros cambios ambientales (Senapathi *et al.*, 2015). Las comunidades de abejas están fuertemente asociadas con la diversidad de especies de plantas (Potts *et al.*, 2003; Batáry *et al.* 2010), por lo tanto, los planes de manejo que no contemplen la diversidad de plantas es poco probable que aumenten la diversidad de abejas, sin importar la cantidad de recursos disponibles.

Un estudio a gran escala, llevado a cabo en cinco taxones de artrópodos en siete países europeos, mostró que las abejas (Apoidea) están entre las especies más sensibles a la intensificación agrícola (Hendrickx *et al.*, 2007). Los estudios sobre polinizadores que visitan flores de colza en América del Sur, Argentina y, en particular, la región de la provincia de Buenos Aires son escasos (Mussury *et al.*, 2003; Araneda Durán *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2010; Blochtein *et al.*, 2014; Witter *et al.*, 2014; Mazzei *et al.*, 2021). La familia Brassicaceae tiene numerosísimas especies cultivadas y silvestres que han sido mencionadas como fuentes de polen y néctar (Crane *et al.*, 1984; Pierre, 2001; Andrada *et al.*, 2005). Dada la escasez de estudios de la fauna entomológica de la región, tampoco se conoce qué otros visitantes florales de *B. napus* obtienen recompensas florales de especies espontáneas de Brassicaceae, que podrían actuar como fuentes alternativas de alimento para estos insectos. El primer paso para profundizar el tema y entender estas relaciones es identificar los insectos que visitan tanto el cultivo como las zonas cercanas ocupadas por vegetación espontánea de las brasicáceas más abundantes en la zona de estudio.

Materiales y métodos

La diversidad y abundancia de visitantes florales fue evaluada simultáneamente en el cultivo de colza y en parches de vegetación espontánea constituida mayormente por especies brasicáceas. El ensayo se repitió durante los años 2017, 2018 y 2019 en la localidad de Tres Arroyos, en la Chacra Experimental Integrada Barrow (-38.319305, -60.239380). Se sembraron parcelas de colza de diferentes cultivares y se delimitaron parches de vegetación natural,

cercanas a las parcelas de colza (menos de 200 m) en los que no se realizó ningún tipo de manejo.

En 2017 se utilizaron dos cultivares de colza, Hyola 433 y Bioaureo 2486, sembradas en parcelas de 1.75 m x 6 m. En 2018 se emplearon los cultivares Hyola 575 y Nuvette 2266, sembrados en parcelas de 2.56 m x 6 m. Por último, en 2019 se usaron los cultivares Hyola 830 y Macacha, también sembrados en parcelas de 2.56 m x 6 m. El diseño experimental en el 2017 fue en bloques al azar con tres repeticiones y dos réplicas por bloque, en el 2018 y 2019 fue en bloques al azar con cuatro repeticiones y dos réplicas por bloque. En el 2017, se colocaron cuatro colmenas a 200 m de las parcelas y se las mantuvo durante los tres años de ensayo.

En todos los años de ensayo el cultivo se llevó a cabo en forma convencional, para lo cual se realizaron labores con una rastra pesada y luego se sembró con una sembradora a chorrillo a una densidad de siembra de 60-70 pl m⁻². Previo a la siembra, se fertilizó con 60 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico y se aplicó trifluralina incorporada a razón de 1.250 l ha⁻¹ para el control de malezas. Cuando el cultivo se encontraba en estado de roseta (cuatro hojas) se efectuó una fertilización con urea de 180 kg ha⁻¹ y 70 kg ha⁻¹ de sulfato de amonio. En este mismo estadio, también se aplicaron 90 cc ha⁻¹ de Dicamba combinado con 250 cc ha⁻¹ de Clopyralid para el control de malezas.

Durante el periodo de floración, se utilizaron trampas de agua de color blanco, adoptado ampliamente en estudios entomológicos, que permite capturar gran diversidad de visitantes florales (Buffington *et al.*, 2021; FAO, 2016; LeBuhn *et al.*, 2012; Toler *et al.*, 2005). Las trampas consistieron en vasos de plástico de 180 ml que se colocaron al azar: seis en la superficie de muestreo de colza y seis en el nabón a la altura de las inflorescencias (Figura 3.1). Los vasos se sujetaron a varillas de hierro torsionado de 8 mm con un adaptador *ad hoc* que permitía regular la altura de los mismos. A cada recipiente se le agregaron aproximadamente 90 ml de agua con escamas de jabón blanco para romper la tensión superficial. Las trampas se activaron semanalmente, durante la floración de ambas especies (cuatro semanas en la colza y entre 7 y 11 semanas en las brassicáceas espontáneas) a las 11:00 h (-3 GMT) de la mañana y se recolectaron a la misma hora del día siguiente (24 h de muestreo). Las muestras de insectos obtenidas fueron etiquetadas y conservadas en etanol al 70%.



Figura 3.1: Trampas de agua de color blanco para capturar los visitantes florales en parches de vegetación espontánea, en la Chacra Experimental Integrada Barrow.

Se contabilizaron los ejemplares correspondientes a los órdenes Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Homoptera, Thysanoptera, Lepidoptera y Heteroptera, mencionados en la bibliografía como los órdenes más relevantes de visitantes florales (Proctor & Yeo, 1973; Barth, 1991). Se enfocó en el recuento de los himenópteros, dada su importancia como polinizadores, discriminando entre los individuos pertenecientes a las subfamilias Apoidea y Vespoidea.

Con el fin de corroborar las identificaciones de insectos a campo, se efectuaron capturas con redes entomológicas. Se colocaron los ejemplares en recipientes etiquetados para su traslado al laboratorio. Se realizaron las identificaciones utilizando lupas estereoscópicas y claves entomológicas (Michener *et al.*, 1994; Michener, 2007; Roig-Juñent *et al.*, 2014), además de consultar con especialistas del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Dr. Arturo Roig Alsina y Dra. Rocío González Vaquero. Las identificaciones se hicieron a nivel de orden y familia. Cuando fue posible, se llegó a nivel de género y especie, o bien de morfoespecie. La categoría de “morfoespecie” se utiliza cuando se detectan y delimitan unidades taxonómicas reconocibles, que resultan del análisis y comparación de caracteres

morfológicos fácilmente observables y no se puede identificar de forma precisa el nivel de género y especie (Mendoza Arroyo *et al.*, 2011; Guzman Jacob, 2013; Fuentes, 2015).

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). Los datos de recuento de insectos fueron transformados a su logaritmo natural (ln) y analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias de LSD Fisher.

Se identificaron las especies de brasicáceas espontáneas que formaban parte de los parches muestreados y se registró el periodo de floración tanto de los parches de espontáneas como del cultivo. Existen varias clasificaciones fenológicas de la colza, que han sido desarrolladas por institutos de investigación. En el presente trabajo se utilizó la escala de estados fenológicos propuesta por el Centro de Estudios de Oleaginosas de Francia, CETIOM (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains) debido a que es la más usada en Argentina y Europa (Aguirre Wibmer & Uriarte Puppo, 2010).

Resultados y discusión

Visitantes florales en colza y brasicáceas espontáneas

Mediante el uso de trampas de agua se estudió la visita de insectos a las flores de brasicáceas a lo largo de tres años de ensayos. De acuerdo a los registros tomados utilizando la escala CETIOM (Uriarte & Valetti, 2008), la floración de la colza ocurrió entre los meses de octubre y noviembre, y duró aproximadamente 30 días en todos los ensayos descritos. A pesar de ser considerado un cultivo de floración larga, los polinizadores requieren otras fuentes de alimento para cumplir su ciclo de vida. La mayoría de los cultivos, como la colza o el girasol, florecen masivamente y proporcionan valiosos recursos para los polinizadores. Sin embargo, estos recursos superabundantes solamente están disponibles durante períodos cortos de tiempo, por lo que su contribución al mantenimiento de poblaciones de polinizadores podría ser de escasa importancia (Rosado Gordón *et al.*, 2002; Westphal *et al.*, 2003; Garibaldi, 2013; Rader *et al.*, 2016).

La posibilidad de que los polinizadores dispongan de recursos alimentarios por períodos prolongados en áreas cultivadas depende de la presencia de especies espontáneas, cuyas floraciones suelen ser más desparejas y extensas que las de los cultivos (Mandelik *et al.*, 2012; Miñarro & Prida, 2013; Morandin & Kremen, 2013; O'Brien & Arathi, 2018) En la zona de estudio fueron identificadas poblaciones de Brassicaceae espontáneas, como el nabón

(*Raphanus sativus* L.) y mostacillas (*Rapistrum rugosum* L. All., *Sisymbrium irio* L., e *Hirschfeldia incana* (L.) Lagr.-Foss.) (Figura 3.2).



Figura 3.2: Parches de vegetación con brassicáceas espontáneas cercanos a las parcelas del cultivo de colza.

En los tres años de ensayos se observó que el inicio del periodo de floración de las especies espontáneas fue previo a la floración del cultivo. Una vez finalizada la floración del cultivo, los visitantes florales continuaron visitando los parches de espontáneas, ya que su floración se extendió, por lo menos, 30 días más (hasta fines de diciembre). Con esto se llega a completar un periodo de floración de brassicáceas espontáneas superior a 90 días, que es tres veces más extensa que la del cultivo de colza.

En todos los años se capturaron un gran número de ejemplares de insectos en los parches de brassicáceas espontáneas (Figura 3.3). Estos resultados confirman que este tipo de plantas tuvieron gran relevancia en cuanto a la oferta de alimentos para los visitantes florales y en dos de los tres años la cantidad de insectos en estas malezas fue significativamente mayor a los que visitaron el cultivo ($p < 0.05$) (Tabla 3.1). A menudo se destacan los efectos adversos y se ignora el aporte favorable que hacen las especies espontáneas al sustento de las poblaciones de polinizadores del cultivo y otros insectos benéficos, tal como afirman Altieri & Nicholls (2004). Otros investigadores (Kearns & Inouye, 1997) han reportado que cuando se elimina este tipo de plantas, o se reduce significativamente su abundancia, se ven perjudicados tanto

las poblaciones de polinizadores como también el rendimiento de algunos cultivos.

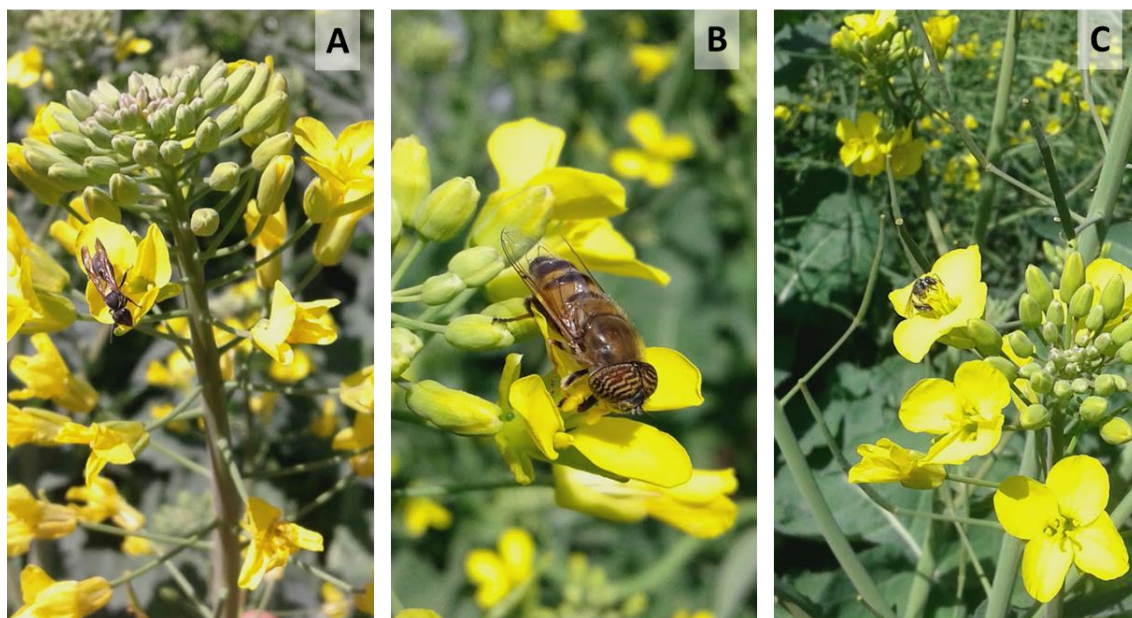


Figura 3.3: Visitantes florales de colza en Tres Arroyos, Chacra Experimental Integrada Barrow. A: *Polybia scutellaris*, B: *Eristalinus taeniops*, y C: Halictidae.

Tabla 3.1: Número de visitantes florales capturados en trampas de agua blancas en el 2017, 2018 y 2019. Letras iguales dentro de una misma fila indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Año	Colza	Brasicáceas espontáneas
2017	149 a	329 b
2018	167 a	348 b
2019	104 a	156 a

Los visitantes florales capturados en las trampas de agua correspondieron a diversos órdenes. En la Figura 3.4, se presenta la información descriptiva de la abundancia de los insectos capturados clasificados de acuerdo al orden taxonómico. A lo largo de este estudio, tanto en la colza como en los parches de brasicáceas espontáneas, los individuos más abundantes pertenecieron al orden Hymenoptera. Los coleópteros se hallaron en mayor porcentaje en las

especies espontáneas respecto al cultivo, siendo *Astylus quadrilineatus* la especie más abundante. Por otro lado, se observó que el porcentaje de lepidópteros fue mayor en el cultivo de colza que en los parches de brassicáceas espontáneas, siendo *Plutella* sp., una reconocida plaga del cultivo, la especie más representada. Los dípteros fueron más abundantes en la colza y, entre ellos, se identificaron varias especies de sírfidos. Los sírfidos encontrados en la zona de estudio pertenecieron a los géneros *Allograpta*, *Toxomerus* y *Eristalis*. Algunos de estos géneros (*Allograpta* y *Toxomerus*) se caracterizan por ser buenos controladores biológicos de pulgones, además de ejercer su función como polinizadores (Díaz *et al.*, 2020; Torretta *et al.*, 2021).

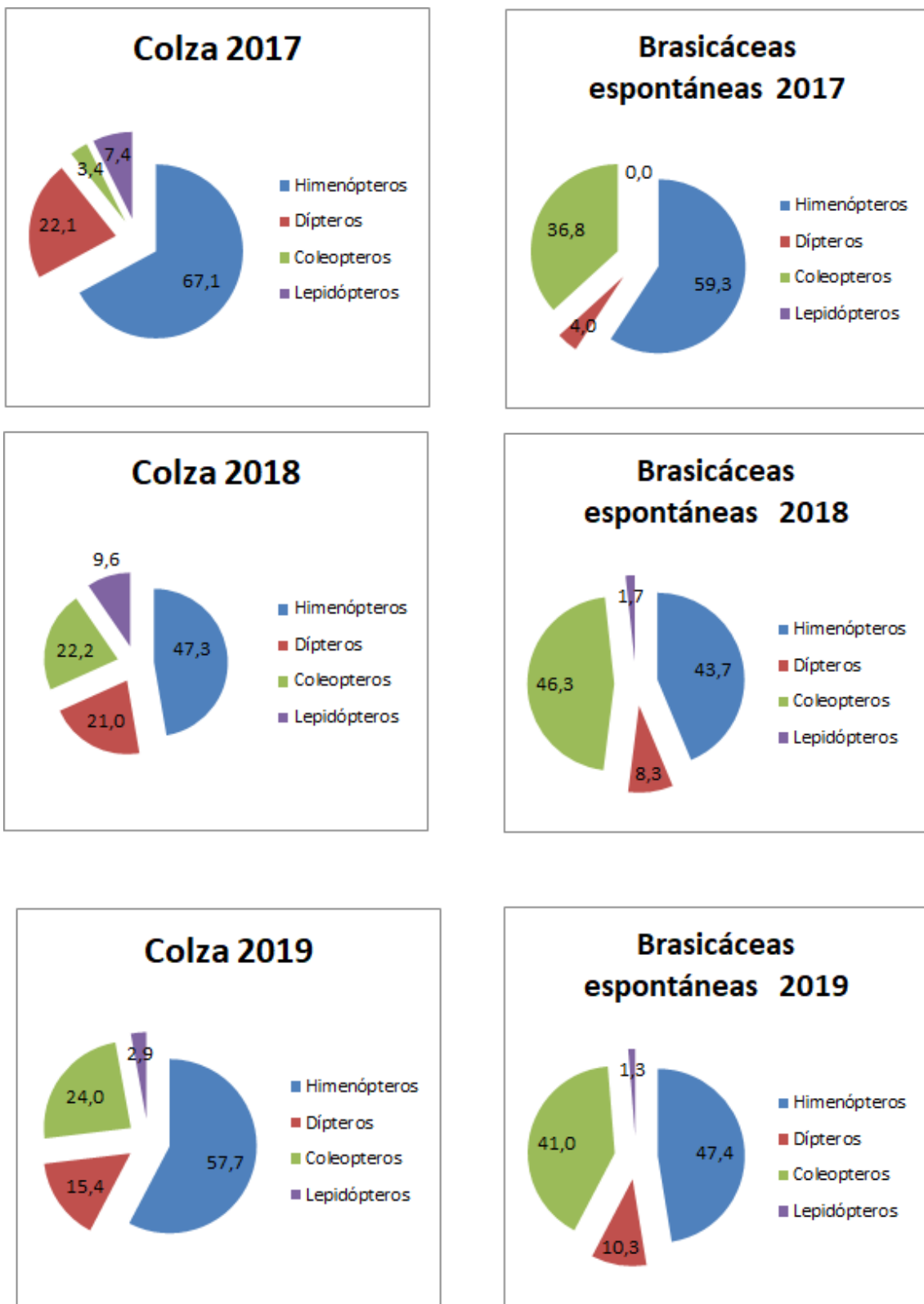
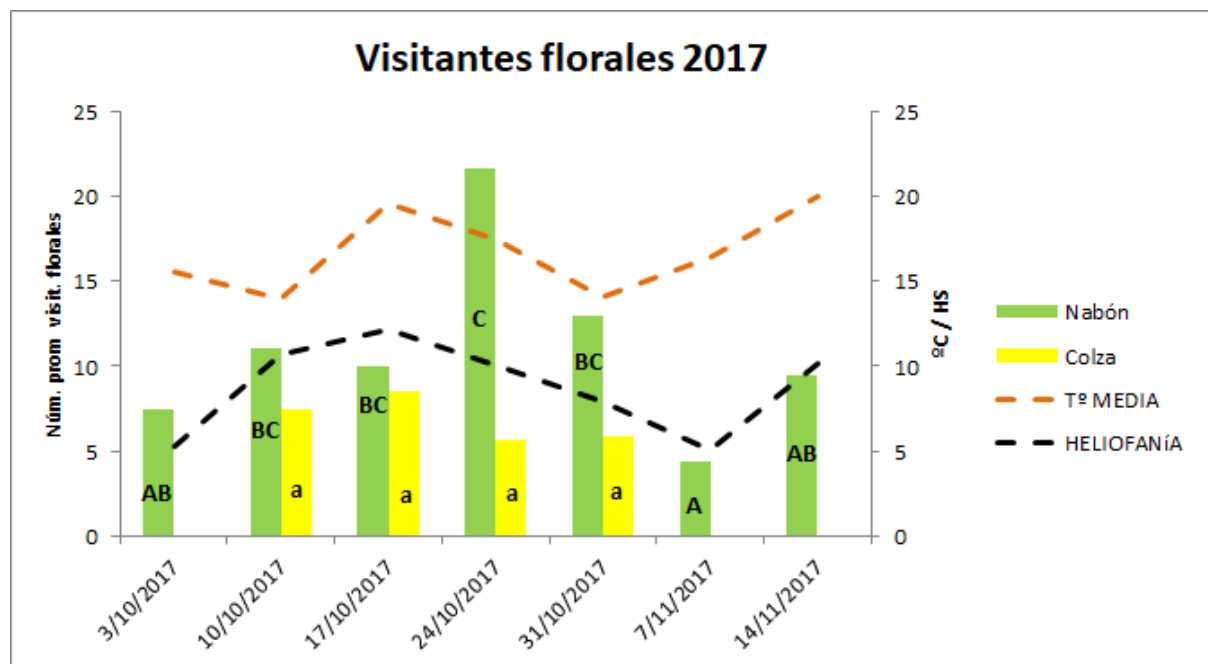


Figura 3.4: Porcentaje de órdenes de visitantes florales de cultivo de colza y brasicáceas espontáneas durante los tres años de ensayo.

Además de los estudios de visitantes florales totales sobre cultivo de colza y especies espontáneas, se contabilizaron los insectos en cada fecha de muestreo. La abundancia de los visitantes florales presentó variabilidad entre fechas de muestreo a lo largo de una misma temporada de floración. En los tres años de ensayos se observó que el inicio y la finalización del periodo de floración de las especies espontáneas fue más estable que la del cultivo (Figura 3.5). La fecha de floración de la colza estuvo determinada por la fecha de siembra y las características propias de cada cultivar. Estos resultados reafirman lo dicho anteriormente de que los insectos disponían de recursos alimenticios de manera más estable debido a las espontáneas. En los tres años de ensayos se capturaron visitantes florales en los parches de espontáneas antes, durante y después de la floración del cultivo.

En el 2017 y 2018 no se registraron diferencias estadísticas en el número de visitantes florales capturados en el cultivo de colza entre las fechas de muestreo ($p > 0.05$). En el 2019 las condiciones climáticas de las dos primeras fechas de muestreo fueron de baja temperatura y poca heliofanía, esto se vio reflejado en el bajo número de capturas. En los dos muestreos siguientes mejoraron las condiciones climáticas y el número de visitantes florales capturados fue significativamente mayor.

Si bien se observó en los parches de espontáneas un menor número de capturas al principio de la temporada, los resultados no fueron concluyentes. De manera similar a lo aportado por otros autores, los días donde los valores de temperatura y heliofanía fueron altos, las capturas fueron mayores (Bajiya & Abrol, 2017).



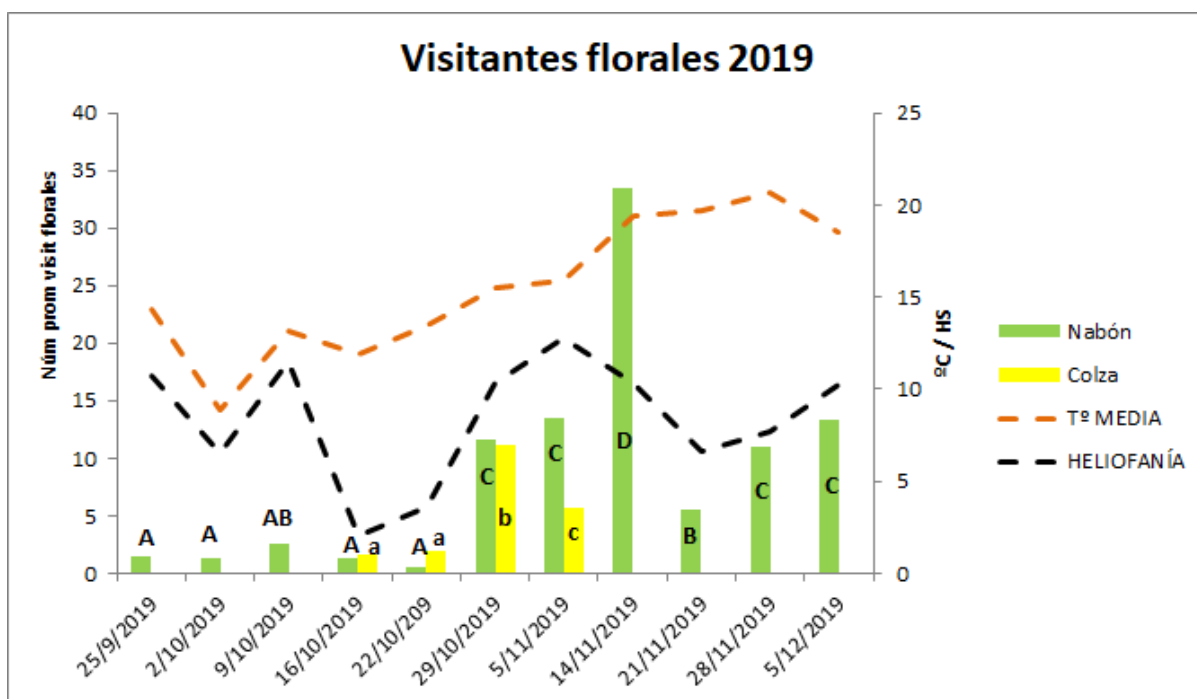
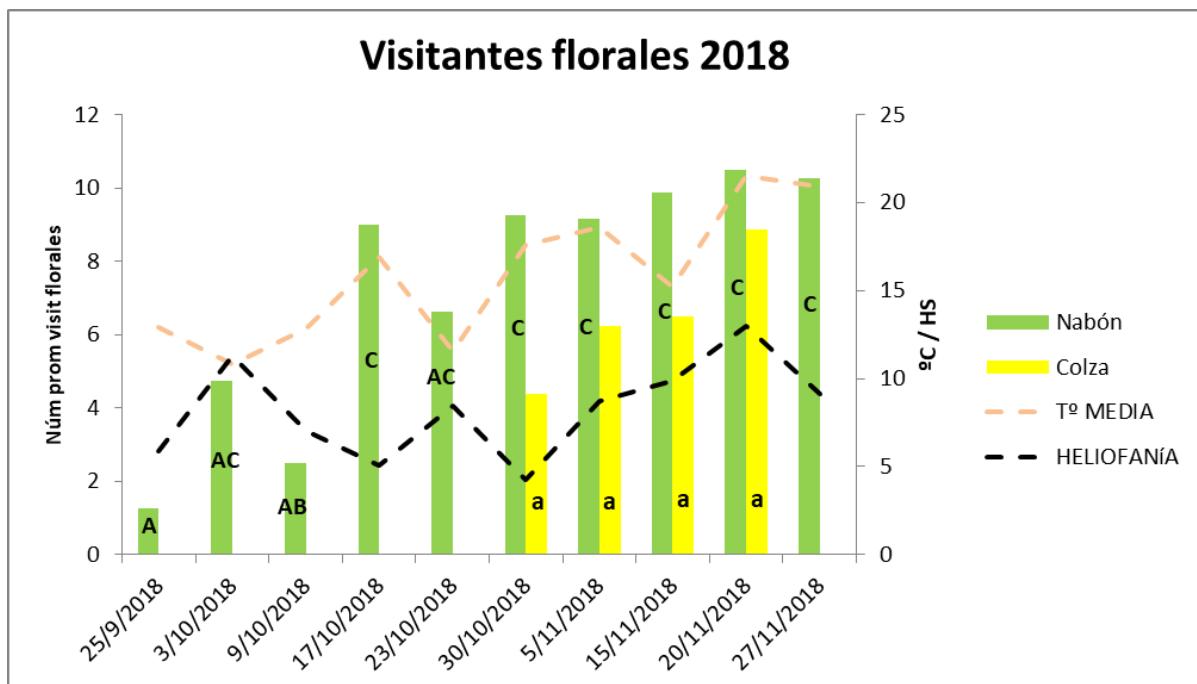


Figura 3.5: Visitantes florales de brasicáceas 2017, 2018 y 2019. Letras minúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las fechas de muestreo para el cultivo de colza. Letras mayúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre fechas de muestreo en los parches de espontáneas.

Himenópteros en colza y brasicáceas espontáneas

En todos los años se capturaron un gran número de himenópteros tanto en el cultivo como en los parches de espontáneas. Sólo en el 2017 el número de ejemplares capturados en los parches fue significativamente mayor que en el cultivo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Número de himenópteros capturados en trampas de agua blancas en el 2017, 2018 y 2019. Letras iguales dentro de una misma fila indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Año	Colza	Brasicáceas espontáneas
2017	97 a	193 b
2018	100 a	158 a
2019	62 a	77 a

Se encontró que la diversidad de himenópteros fue similar entre los sitios de muestreo, aunque la abundancia resultó variable. En el cultivo de colza, los himenópteros sociales estuvieron más representados que en los parches de brasicáceas espontáneas. Por lo contrario, en estos últimos se capturaron mayores porcentajes de especies no sociales (nativas).

Al igual que Williams *et al.* (2001) y Roubik, D. (2001) quienes encontraron que la abundancia de abejas tenía una fluctuación asincrónica entre los diferentes años, en los ensayos de esta tesis el porcentaje de las especies más abundantes fue variable entre los años de muestreo. Tanto en el cultivo como en los parches de espontáneas, *Campsomeris bistrimaculata* fue la especie más representada (Tabla 3.3). En todos los años de muestreos, la abundancia de la abeja melífera fue mayor en el cultivo de colza que en los parches de espontáneas. En el 2017 y 2018, los halictidos presentaron una proporción similar tanto en el cultivo como en las espontáneas. A pesar de esto, en el 2019 fueron más abundantes en los parches de espontáneas. Según Kremen *et al.* (2002) la diversidad de polinizadores es necesaria para amortiguar las variaciones poblacionales que se dan naturalmente entre años. Por lo tanto, especies relativamente poco importantes en un año se pueden convertir en las más abundantes el año siguiente.

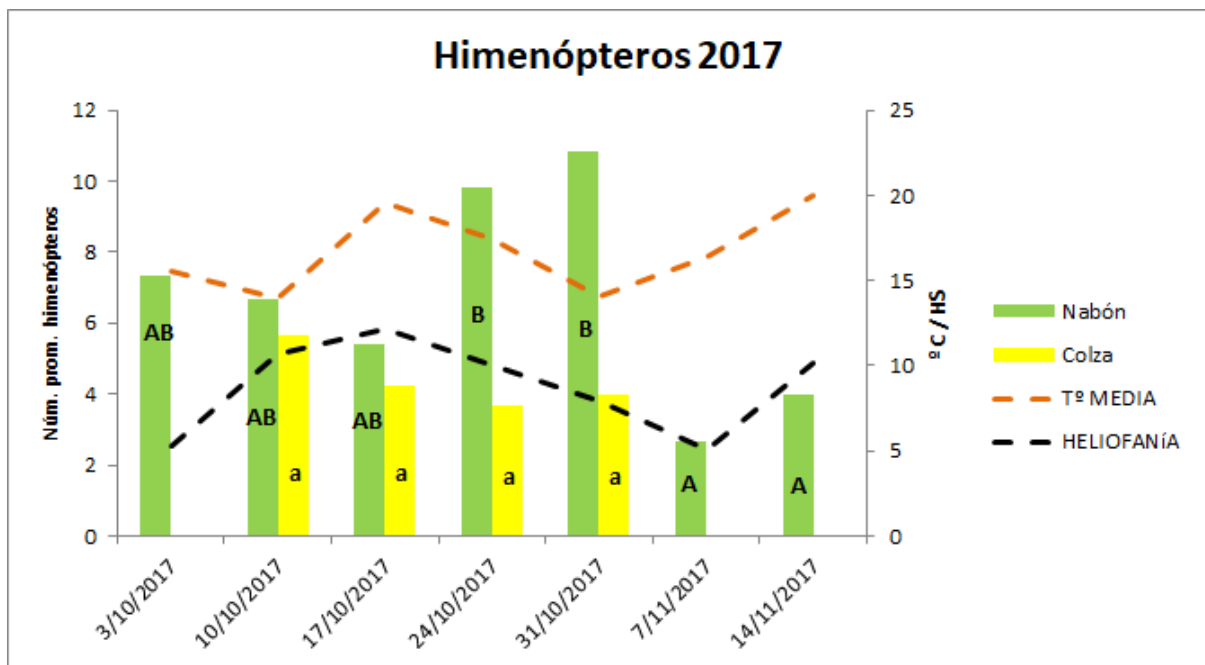
Tabla 3.3: A) Capturas según el tipo de flora en los años 2017, 2018 y 2019, expresada en porcentaje, según el grado de sociabilidad de los himenópteros. B) Capturas según la flora en el 2017, 2018 y 2019, expresada en porcentaje para los distintos grupos de himenópteros. BE: Brassicáceas Espontáneas.

Año	2017		2018		2019	
Especie	Colza	BE	Colza	BE	Colza	BE
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
A: Sociabilidad						
Sociales	36.0	5.2	33.3	9.1	18.3	11.3
No sociales	64.0	94.8	66.7	90.9	81.7	88.7
B: Taxa						
<i>Apis mellifera</i>	30.0	5.2	31.3	8.4	18.3	11.3
Halictidae	22.0	23.5	23.2	35.1	31.7	70.0
<i>Xylocopa augusti</i>	2.0	0.5	0	0	0	0
<i>Campsomeris bistrimaculata</i>	40.0	70.9	43.4	55.8	50	18.8
Otras avispas	6.0	0	2.0	0.7	0	0

La mayoría de las abejas capturadas en los ensayos de esta tesis fueron especies solitarias que anidan en el suelo. Observaciones propias sobre insectos cautivos de los taxa *Bombus* sp. (reinas), *Campsomeris* sp. y Halictidae, realizadas en el laboratorio, indicaron que estos se refugian cavando en el suelo. Las áreas sin cultivar no solo proporcionan recursos alimenticios a los polinizadores; también son sitios aptos para la reproducción de muchas especies de abejas (Ricketts, 2008; Garibaldi, 2011). Esto coincide con la bibliografía internacional que indica que varias familias, incluyendo las de los polinizadores arriba mencionados, nidifican en el suelo (Kearn & Inouye., 1997; Villemant, 2005; Michener, 2007; Roig-Juñent *et al.*, 2014).

Estas observaciones llevan a suponer que las zonas poco disturbadas beneficiarían a las poblaciones de estos insectos. Williams (1986), Delaplane & Mayer (2000) y Garibaldi *et al.* (2014) encontraron que el número de polinizadores silvestres en los cultivos se correlacionó positivamente con la proximidad de tierras sin cultivar. Steffan-Dewenter *et al.* (2002) concluyeron que en ambientes agrícolas la diversidad y la abundancia de abejas solitarias estaba fuertemente correlacionada con la cantidad de tierra seminatural cercana (a menos de o hasta unos 750 m). Para las abejas sociales presentes en la zona de estudio, como *Bombus* sp. y *Apis mellifera*, no pudieron determinar que existiera esta misma relación. La destrucción de áreas naturales con grandes superficies de cultivos perjudica mayormente a las abejas solitarias en comparación con las abejas sociales (Steffan-Dewenter *et al.* 2002).

La abundancia de los himenópteros en las diferentes fechas de muestreo a lo largo de una misma temporada de floración se presenta en la Figura 3.6. Este estudio no mostró un patrón en cuanto a la evolución de la población de himenópteros a lo largo de los periodos analizados. Esta información coincide con lo reportado en países europeos (Roubik, 2001; Kremen, 2002).



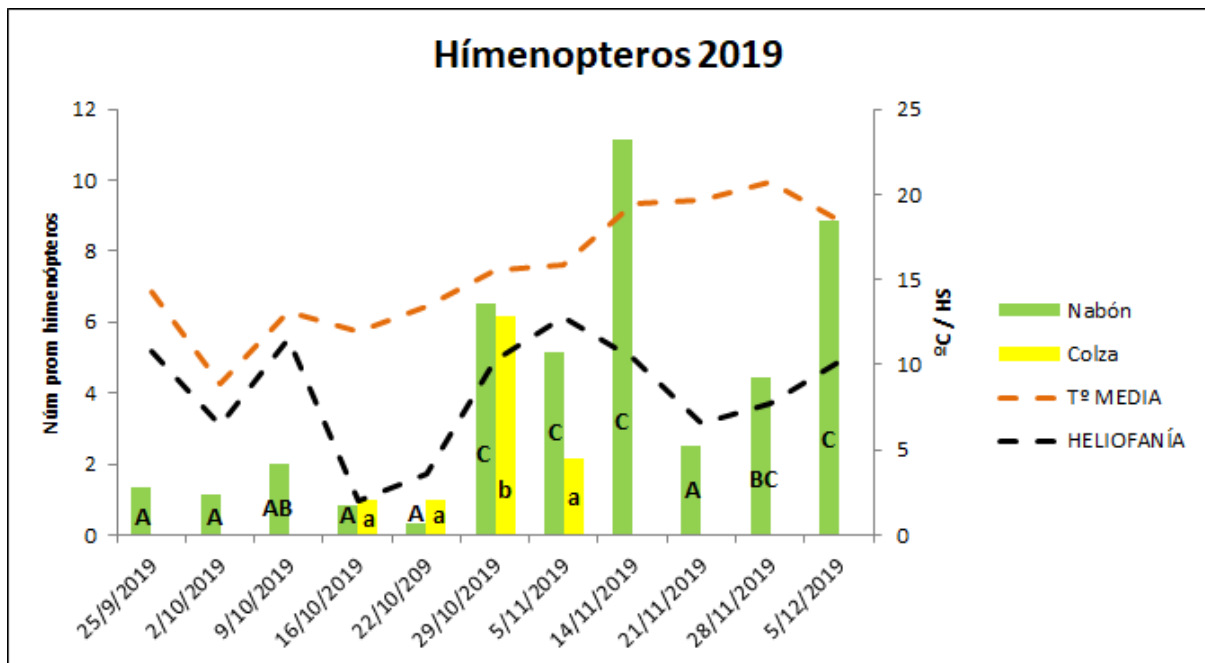
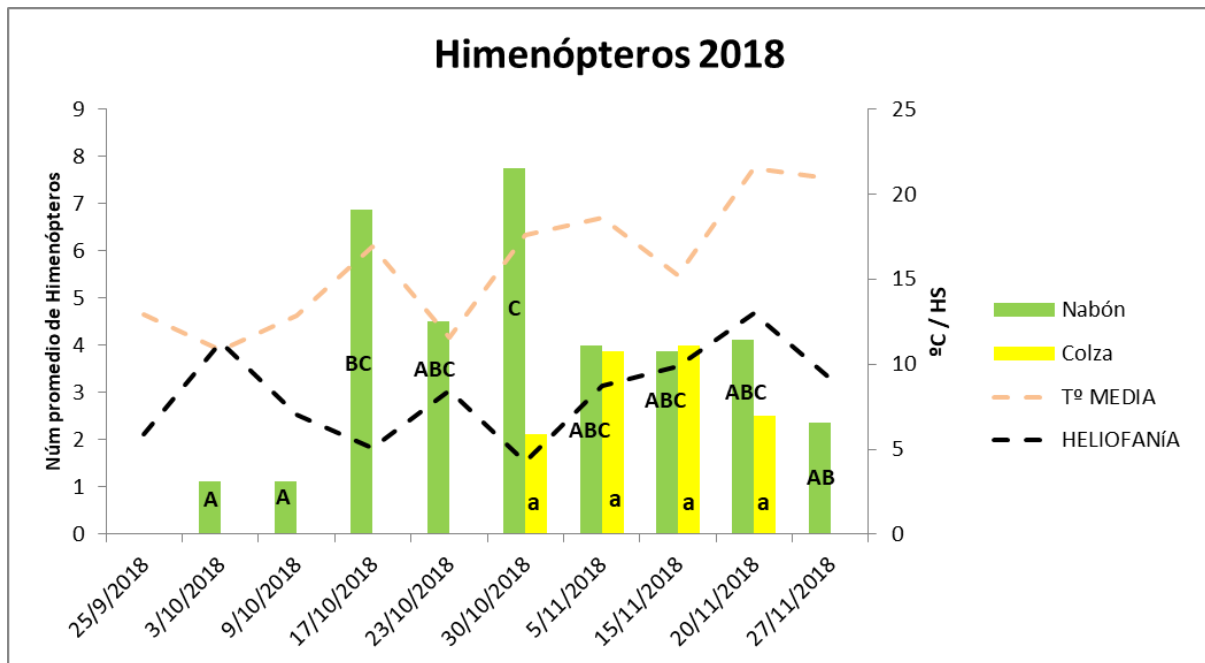


Figura 3.6: Himenópteros capturados semanalmente en trampas de agua blancas durante 2017, 2018 y 2019. Letras minúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las fechas de muestreo para el cultivo de colza. Letras mayúsculas iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre fechas de muestreo en los parches de espontáneas.

Conclusiones

En los cultivos de colza y en los parches de espontáneas situados en el centro sur bonaerense se registraron numerosos órdenes de visitantes florales. Todas las especies identificadas se encontraron tanto en el cultivo como en las malezas aledañas.

Las poblaciones de visitantes florales silvestres fueron variables entre los años muestreados. Al igual que en la colza, el grupo de los himenópteros resultó el más representado en los parches de espontáneas.

Las zonas con brasicáceas espontáneas, aledañas a la colza, brindaron recursos a los visitantes florales antes, durante y después de la floración del cultivo.

Capítulo 4: Carga polínica y tamaño del cuerpo de los principales visitantes florales del cultivo de colza en el centro sur bonaerense

Introducción

Los servicios ecosistémicos son procesos naturales que benefician a los seres humanos. Uno de los más destacados es la polinización y es llevado a cabo por una amplia gama de insectos. En la búsqueda de recursos los polinizadores transfieren el polen desde las anteras hasta los estigmas, ya sea de la misma o de distintas flores. 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, la alimentación de las larvas, longevidad y, particularmente en la abeja melífera la productividad de la colonia (Kleinschmidt & Kondos, 1978; Di Pasquale, 2016). Según Nicolson & 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.

El número de granos de polen que depositan los polinizadores en las flores en cada visita depende de las características morfológicas de la flor y del insecto y su comportamiento, y puede variar ampliamente entre taxa (Ivey *et al.*, 2003; King *et al.*, 2013). Algunos visitantes florales pueden ser parcial o totalmente ladrones de néctar, es decir que lo obtienen sin entrar en contacto con las estructuras reproductivas y, por lo tanto, no depositan polen sobre la flor (Maloof & Inouye, 2000; Junker *et al.*, 2010). Factores como la longitud del cuerpo o la distancia intertegular, y/o la pubescencia pueden influir en la cantidad de polen depositado en los estigmas (Goulson *et al.*, 2002; Stavert *et al.*, 2016).

El tamaño del cuerpo es una característica clave de los organismos, y varía continuamente debido a los efectos de la selección natural (Chown & Gaton, 2010). Estudios recientes han demostrado que están ocurriendo cambios en el tamaño de los polinizadores (o en un rasgo funcional correlacionado con el tamaño del cuerpo) en muchos hábitats como resultado del cambio climático y la homogeneización del paisaje (Miller-Struttman *et al.*, 2015; Renauld *et al.*, 2016). El tamaño de los polinizadores influye significativamente en la relación con otros organismos y con el ambiente. En redes mutualistas, como los sistemas de polinización, un tamaño de cuerpo adecuado garantiza la coincidencia morfológica con las flores y asegura que

ambas partes se beneficien de la interacción (De Luca *et al.*, 2019). Se cree que la coincidencia morfológica entre polinizadores y flores refuerza la fidelidad floral, ya que asegura que todos los involucrados se beneficien al máximo: extracción de recursos para el polinizador y transferencia exitosa de polen para la planta (Anderson *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2016; Solís-Montero & Vallejo-Marín, 2017).

La utilización del tamaño de los himenópteros es fundamental para estandarizar comparaciones de energía, ecología de pecoreo, alometría, anatomía, reproducción y comportamiento sexual y biología de nidificación, entre otros (Cane, 1987). Además, es un buen estimador del área de alimentación y nidificación, ya que parece limitar las distancias que las abejas pueden recorrer (Bailey *et al.*, 2014). La distancia intertegular (DI) es un adecuado estimador del tamaño de los insectos y permite hacer comparaciones alométricas entre especies (Bailey, 2014). Según Hagen & Dupont (2013), el tamaño del cuerpo de las abejas se relaciona con rasgos de su historia de vida y, por lo tanto, este parámetro es comúnmente utilizado en estudios ecológicos. El tamaño es difícil de medir en individuos vivos o en ejemplares secos en los museos que se les haya contraído el abdomen o hayan quedado en un ángulo inapropiado para realizar las mediciones. En abejorros se sabe que la distancia intertegular y el ancho de cabeza son parámetros directamente relacionados con el tamaño del cuerpo (Hagen & Dupont, 2013).

Cada vez es más reconocida la contribución de abejas silvestres y otros grupos de insectos (por ejemplo, moscas, escarabajos, mariposas) a la polinización dentro de los ecosistemas naturales y agrícolas (Ollerton *et al.*, 2011; Garibaldi *et al.*, 2013; Rader *et al.*, 2016). De toda la clase Insecta, el orden Hymenoptera es el más beneficioso para el hombre y contiene muchas especies valiosas como parasitoides y predadores; también se encuentran los principales polinizadores, es decir, las abejas (Borror *et al.*, 1989). En estas últimas, el tamaño corporal influye en comportamientos relacionados con la alimentación, la distancia y eficiencia de pecoreo (es decir, cantidad de polen o néctar recolectado por unidad de tiempo) (Peat *et al.*, 2005; Greenleaf *et al.*, 2007; Zurbuchen *et al.*, 2010).

Dentro de los himenópteros, se pueden caracterizar dos grandes grupos de visitantes florales: por un lado, se encuentran las abejas pertenecientes a la superfamilia Apoidea y, por el otro, las avispas que componen las superfamilias Sphecoidea y Vespoidea. Estos grupos comparten ancestros en común (Michener *et al.*, 1994). El hábito de aprovisionar los nidos con alimento de origen animal, como insectos y arañas, se mantiene sólo en las avispas, ya que las abejas se han ido diferenciando utilizando el polen como alimento principal de su descendencia. Junto con estos cambios en el hábito alimentario, se desarrollaron una serie de cambios morfológicos

y cambios de comportamiento. Las abejas presentan el cuerpo cubierto densamente por pelos largos y ramificados (Pasteels & Pasteels, 1972, citado de Thorp, 1979; Michener, 2007) que les proporcionan una mayor superficie para la adherencia de polen. Las avispas tienen escasos pelos simples y cortos. Además de los pelos, las abejas exhiben otras adaptaciones para la obtención, manipulación y empaque de polen que les facilita el transporte hasta el nido de cría (Thorp, 1979). Incluso las abejas macho son a menudo peludas y acumulan considerable cantidad de polen en sus cuerpos mientras buscan néctar, por lo tanto, pueden desempeñar papeles importantes en la polinización (Thorp, 2000).

Como se mencionó anteriormente, existen muchas especies de abejas que presentan diferencias morfológicas y de comportamiento. Las hembras son las encargadas de transportar el polen recolectado en las flores hacia el nido de cría. Algunas poseen estructuras especializadas en su tercer par de patas llamadas corbículas. Las corbículas o “canastas de polen” son placas cóncavas con pelos largos y curvos en la tibia posterior (Morse & Hooper, 1992). Allí, las abejas comprimen los granos de polen cosechados junto con néctar y secreciones propias formando una única masa densa de polen con forma arriñonada (carga corbicular). Estas estructuras son típicas de la familia Apidae, incluidas las tribus Apini (abejas melíferas), Bombini (abejorros), Euglossine (abejas de las orquídeas) y Meliponini (abejas sin aguijón). Otras especies de abejas, recogen los granos de polen en estructuras llamadas escopas, las cuales consisten en concentraciones densas de pelos alargados alrededor de las patas (Halictidae y Andrenidae) o en la parte ventral del abdomen (Megachilidae) donde los granos de polen no se unifican, sino que quedan adheridos a esta estructura. Según Parker *et al.*, (2015), la forma en que las abejas preparan el polen para su traslado, afecta su capacidad para fecundar las flores. Concluyeron que el polen sobre el cuerpo de las abejas y el polen escopal es completamente funcional para la formación de frutos; en contraste, el polen corbicular se deteriora y, por lo tanto, disminuye significativamente su capacidad de fecundar las flores.

Para muchas familias, incluyendo Brassicaceae, la presencia de insectos es esencial en el transporte de polen (Ricketts *et al.*, 2008). La eficiencia en la polinización difiere entre especies y la capacidad de comparar esta efectividad se dificulta debido a la inconsistencia de la metodología utilizada entre los diferentes investigadores (Ne'eman *et al.*, 2010). Con respecto a las metodologías, los investigadores han utilizado uno o una combinación de parámetros para evaluar la efectividad de los insectos como polinizadores. Estos pueden incluir información sobre la frecuencia y la duración de las visitas, la cantidad de granos de polen adheridos al cuerpo (Garibaldi *et al.*, 2013; Howlett *et al.*, 2018), la cantidad de polen depositado en los

estigmas en una sola visita (King *et al.*, 2013), el número de tubos polínicos desarrollados dentro de los estilos (Zhang *et al.*, 2015) y/o el conjunto de frutos o semillas desarrollados (Garratt *et al.*, 2014).

En la mayoría de las técnicas mencionadas anteriormente, el tiempo y la mano de obra, normalmente, son limitantes para llevarlas a cabo con éxito; sobre todo si se quieren evaluar en numerosos individuos. Una de las técnicas más comúnmente utilizadas es exponer flores vírgenes a las visitas de los polinizadores y luego cuantificar los granos de polen que se depositaron en el estigma, lo que requiere el seguimiento de las flores vírgenes hasta que un insecto complete su visita (Rader *et al.*, 2009; King *et al.*, 2013). En estos estudios, puede ser difícil identificar con precisión el polen a nivel de especie, ya que, el polen depositado tiene que ser conespecífico, compatible y viable en el estigma receptivo para que se produzca la fecundación (Ne'eman *et al.*, 2010). Por lo tanto, los resultados de esta técnica pueden ser altamente impredecibles, ya sea en el tiempo empleado como en el tipo de especies que visitan las flores. Por el contrario, la estimación de polen suelto en el cuerpo de los polinizadores (polen no recolectado activamente en las corbículas) es menos laborioso e intensivo (Dafni, 1992) y podría usarse para evaluar eficiencia de polinización (Howlett *et al.*, 2011). Cuanto mayor sea el número de granos de polen en el cuerpo de un insecto, mayores son las posibilidades que tiene de transferir polen viable y compatible a los estigmas y asegurar una polinización y fertilización exitosa (Freitas, 1997). Según ensayos realizados por Howlett *et al.* (2011), sobre una especie brasicácea, el número de granos de polen en el cuerpo de los insectos se relaciona directamente con la cantidad de polen que estos dejan sobre el estigma cuando visitan las flores. La técnica propuesta por este autor tiene la ventaja de que el investigador puede seleccionar específicamente las especies de polinizadores directamente de las flores, lo que permite un mayor número de muestras y especies a obtener. El muestreo debe ser de al menos 10 y preferiblemente más de 30 individuos para obtener una correcta estimación media (Howlett *et al.*, 2011). Entre las diversas técnicas que existen para la cuantificación de polen (Dafni *et al.*, 2005), se encuentra el Hemocitómetro o cámara de Neubauer; se presenta como una herramienta muy eficiente, cuyo uso data de muchos años atrás (Oberle & Goertzen, 1952; Maêda, 1985) pero se continúa utilizando en la actualidad (Astiz & Hernández, 2014; Pinheiro-Costa *et al.*, 2018; Grandinetti, 2022).

La variedad de insectos presentes en el cultivo de colza en el centro sur de Bueno Aires, llevó al objetivo de este capítulo que fue determinar si el tamaño de los principales visitantes florales de colza influye en el número de granos de polen adheridos en el cuerpo.

Materiales y métodos

La cantidad de granos de polen en el cuerpo de los principales visitantes florales de colza, *Brassica napus* L., en el centro sur bonaerense fue evaluado durante 2019 en parcelas de colza ubicadas en la Chacra Experimental Integrada Barrow en la localidad de Tres Arroyos (-38.319305, -60.239380). Esta variable se estudió en los grupos de visitantes florales más abundantes en el cultivo, que surgen de los resultados obtenidos previamente con trampas de agua de colores.

En el ensayo descrito en el primer capítulo, se estableció que los himenópteros más abundantes que visitaron las flores de colza fueron individuos de *Apis mellifera*, *Campsomeris bistrimaculata* y de la morfoespecie Halictidae. *A. mellifera* fue clasificada según su comportamiento sobre las flores de colza, en pecoreadoras de néctar (*A. mellifera* néctar) y pecoreadoras de polen (*A. mellifera* polen). Los ejemplares de *C. bistrimaculata* se diferenciaron según su morfología, por lo que las hembras se analizaron independiente de los machos. Los halictidos capturados fueron hembras y en todos los casos se los observó pecoreando polen.

Las capturas de los ejemplares estudiados se realizaron directamente sobre las flores del cultivo. Se muestrearon 20 ejemplares de cada grupo (Freitas, 1997). Para esto, se utilizaron viales individuales de 15 ml. Cada polinizador fue identificado, capturado directamente con el vial y colocado en una conservadora para su traslado al laboratorio. Los viales se etiquetaron y colocaron en freezer a -16 °C hasta su análisis.

Para determinar la cantidad de granos de polen en el cuerpo de los visitantes florales se utilizó la metodología descrita por Marconi & Gallez (2014). Esta consistió en lavar individualmente los insectos capturados en una solución de agua destilada y detergente (40 ml de agua destilada y 0.2 g de Tween 20). El detergente permitió liberar con mayor facilidad los granos de polen adheridos en el cuerpo del insecto para los conteos correspondientes. En el caso de las abejas melíferas registradas como “*A. mellifera* polen”, se les retiró el tercer par de patas ya que presentaban cargas corbiculares y este polen no se encuentra disponible para la polinización (Delaplane *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2015).

Una vez preparada la solución inicial, se colocaron 3 ml en los viales que contenían los individuos capturados y se agitó en vórtex durante 10 minutos. Posteriormente, se retiró el cuerpo del insecto y se lo enjuagó con 1 ml de agua destilada que fue colocada dentro del vial.

Los 4 ml resultantes fueron centrifugados durante 10 minutos a 2500 rpm. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó agua destilada hasta completar un volumen de 1 ml. Para garantizar la homogeneidad de la solución, se agitó con un vórtex. De la muestra homogeneizada, se tomaron cuatro alícuotas para contabilizar los granos de polen en una cámara de Neubauer de 0.9 mm^3 (Figura 4.1). Se promediaron esas cuatro alícuotas y se calculó el número de granos de polen por insecto. El conteo se realizó en un microscopio óptico con un aumento de 400X.



Figura 4.1: Elementos de laboratorio utilizados. A: vórtex; B: cámara de Neubauer; C: tubo Falcon de 15 ml; D: pipeta Pasteur.

A cada uno de los ejemplares lavados se les realizaron tres mediciones: el largo del ala derecha (LA), la distancia intertegular (DI) y el ancho de la cabeza (AC) (Figura 4.2). Se utilizó un calibre marca Rok con una precisión de 0.01 mm. Se compararon los diferentes grupos de polinizadores, tomando en cuenta cada una de estas variables. Para los análisis estadísticos, se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018) y el diseño fue completamente al azar. Previamente se corroboró la homocedasticidad y normalidad de los datos que fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA). Las medias se compararon mediante el test de LSD Fisher.



Figura 4.2: Longitud del ala anterior derecha (LA), ancho de cabeza (AC) y distancia intertegular (DI).

Resultados y discusión

Según rasgos morfológicos, biológicos y de comportamiento, se diferenciaron dos grandes grupos. Por un lado, están los individuos de la superfamilia Apoidea, es decir, las abejas; por el otro, la especie *Campsomeris bistrimaculata* que pertenece a la superfamilia Sphecoidea, familia Scoliidae, y son avispas. A *C. bistrimaculata* comúnmente se la conoce como “avispa de las flores”, ya que presenta una intensa actividad de pecoreo sobre éstas. Si bien las avispas no precisan recolectar polen para alimentar a sus crías, requieren néctar para satisfacer sus necesidades energéticas en estado adulto; es en ese momento donde sus cuerpos se llenan de polen. Otra de las características de esta especie, es que presenta dimorfismo sexual (Figura 4.6). Las hembras tienen antenas más cortas, diferente coloración y son considerablemente más grandes que los machos. Esto último les provee a las hembras mayor superficie para trasladar granos de polen.

Dentro de los grupos estudiados, las hembras de *C. bistrimaculata* presentaron la mayor longitud de ala, diferenciándose del resto de los grupos ($p < 0.05$). Los machos de *C. bistrimaculata* tienen alas más grandes que *A. mellifera* y que los halictidos. Éstos últimos son

el grupo de visitantes florales con el menor tamaño de ala y se diferenciaron de los grupos restantes (Figura 4.3).

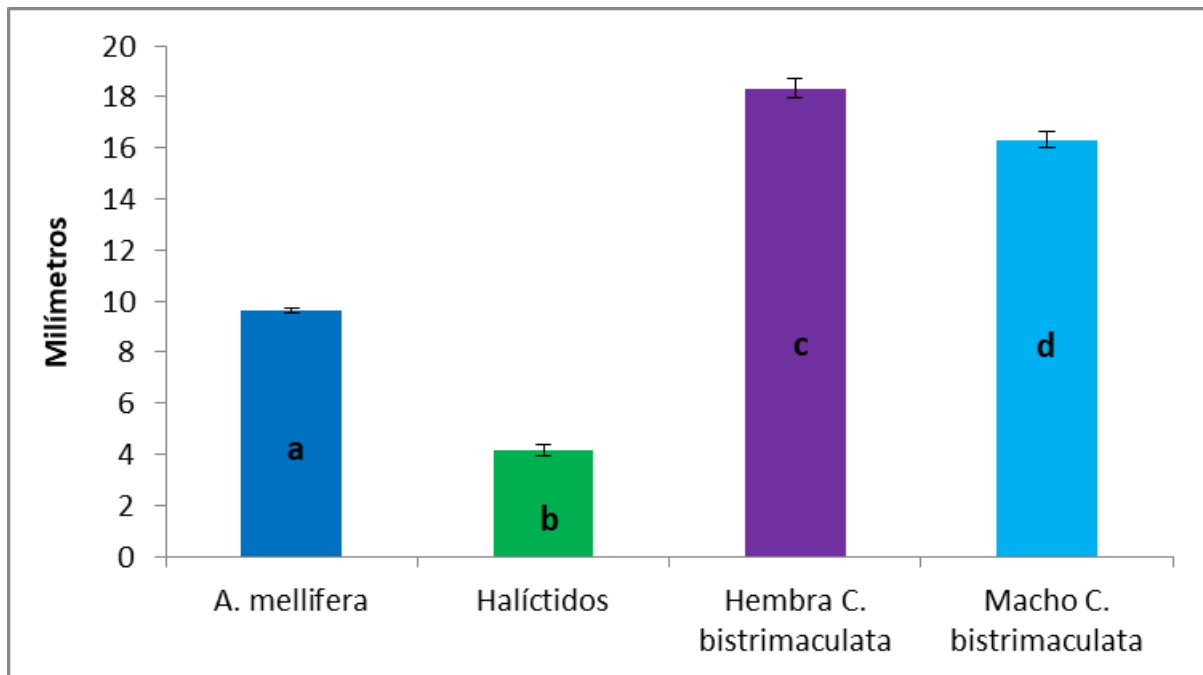


Figura 4.3: Longitud del ala derecha de los principales visitantes florales de colza en el centro sur bonaerense. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos analizados.

No se registraron diferencias estadísticas en el tamaño de cabeza entre *C. bistrimaculata* macho y *Apis mellifera* ($p > 0.05$). Las hembras de *C. bistrimaculata* fueron las que presentaron mayor tamaño de cabeza y los halictidos las más pequeñas, ambos grupos se diferenciaron del resto de los visitantes florales ($p < 0.05$) (Figura 4.4).

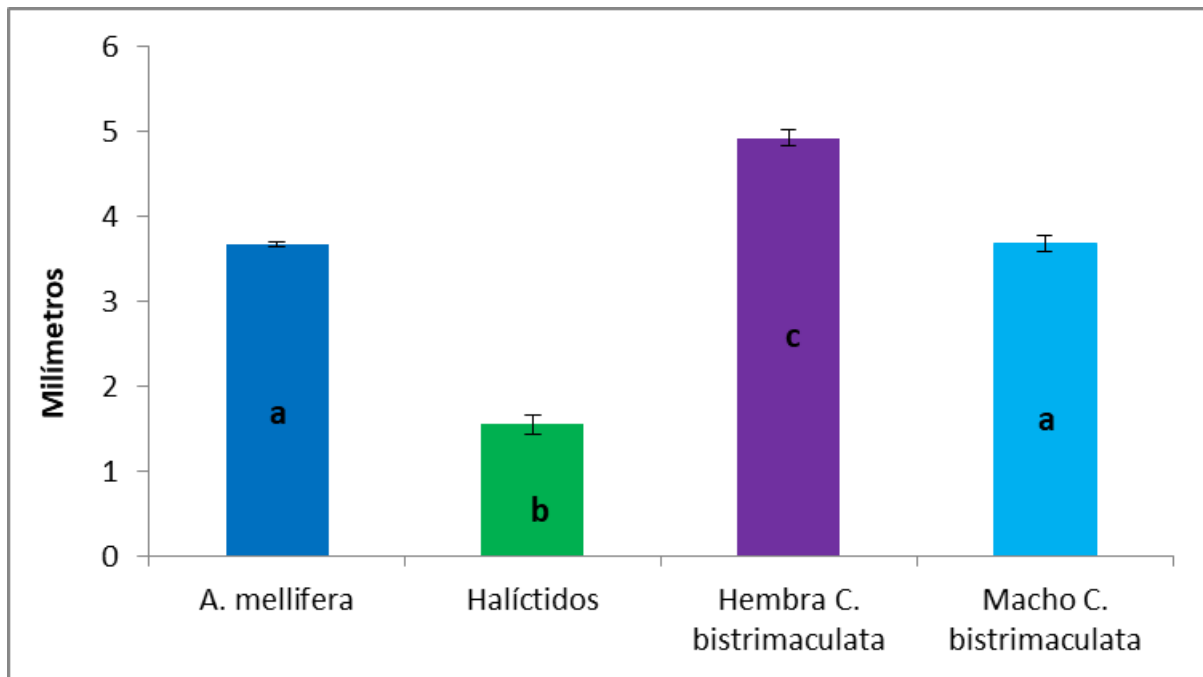


Figura 4.4: Ancho de la cabeza de los principales visitantes florales de colza en el centro sur bonaerense. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos analizados.

Para la distancia intertegular, los resultados fueron iguales que para el tamaño del ala; es decir que se obtuvieron diferencias significativas entre todos los grupos de visitantes florales. Las hembras de *C. bistrimaculata* fueron las de mayor distancia intertegular, seguidas por los machos, luego por *A. mellifera* y, por último, la morfoespecie Halictidae ($p < 0.05$) (Figura 4.5).

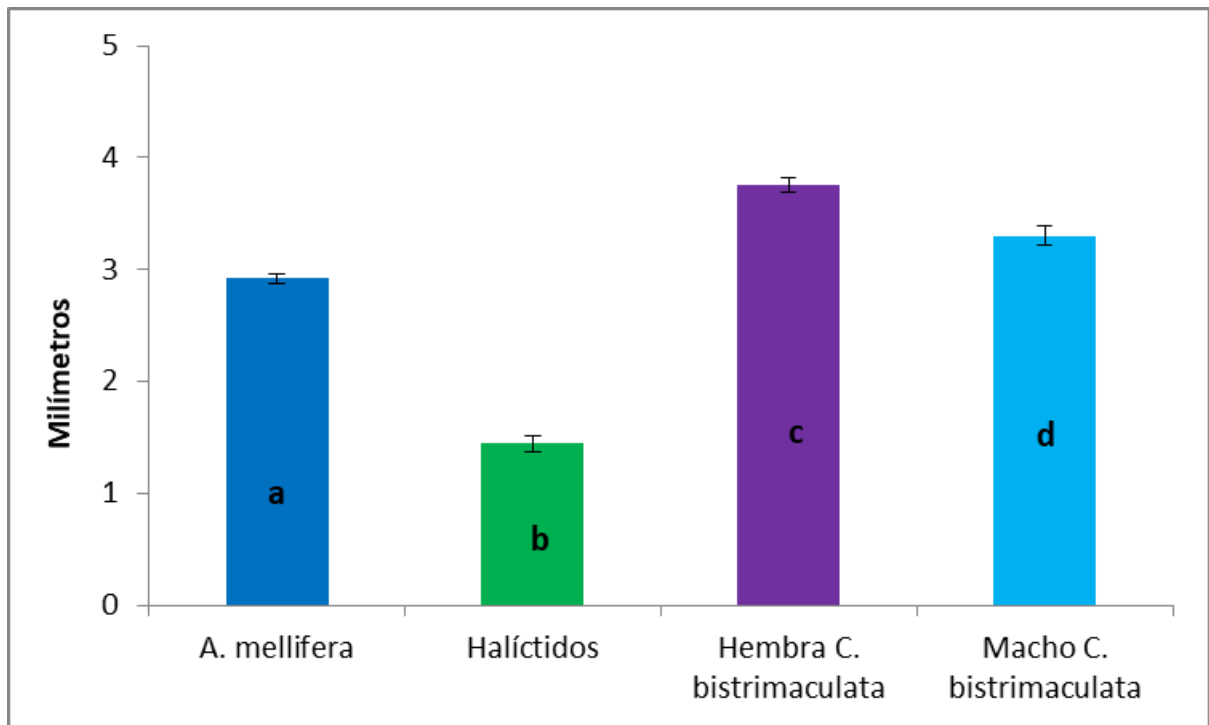


Figura 4.5: Longitud de la distancia intertegular de los principales visitantes florales de colza en el centro sur bonaerense. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos analizados.

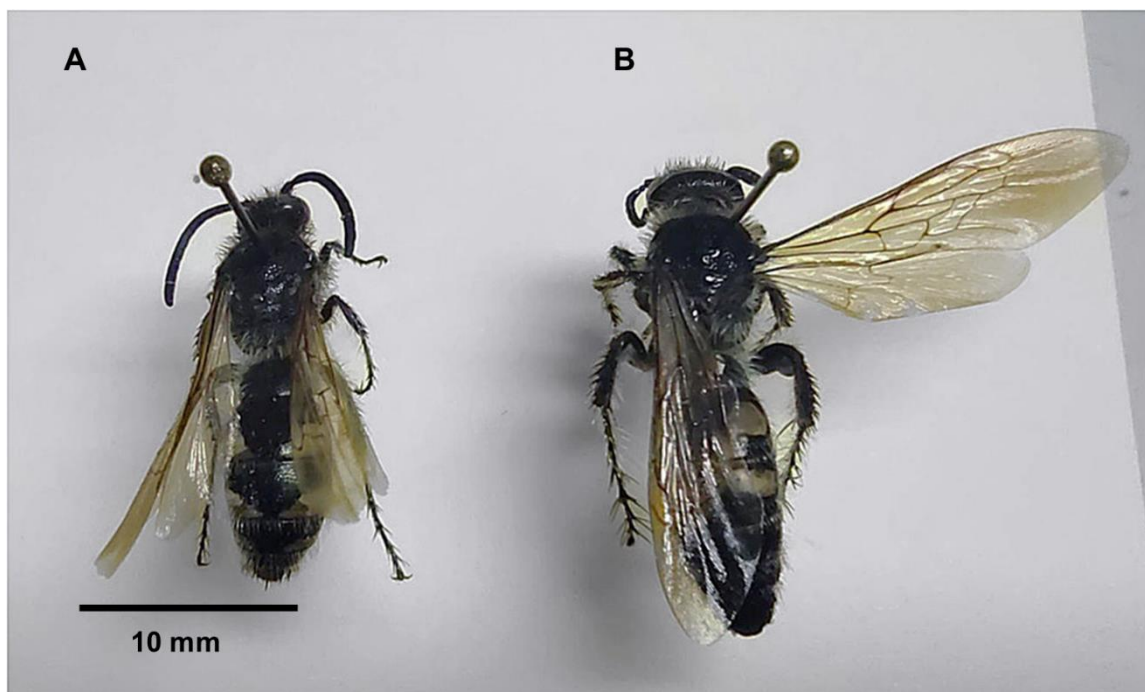


Figura 4.6: Detalle de individuos de *Campsomeris bistrimaculata*. A: macho; B: hembra.

A. mellifera “polen” fue el grupo que presentó mayor cantidad de granos de polen sobre el cuerpo con un promedio de 26.497 por abeja. Otro grupo que tuvo buena cantidad de polen sobre el cuerpo fueron los halíctidos, con una media de 24.139 granos de polen por individuo. Cabe destacar que este grupo presentó los ejemplares de menor tamaño en comparación a los restantes grupos. *A. mellifera* “néctar” tuvo un promedio cercano a los anteriores de 21.514 granos de polen por abeja, seguido por *C. bistrimaculata* hembra que presentó una media de 19.078 granos de polen por avispa. Entre estos cuatro grupos no se detectaron diferencias estadísticas, por lo que, a pesar de tener distintas cantidades de polen promedio, no se puede concluir que una especie traslade mayor cantidad de polen que otra. A diferencia de esto, los machos de *C. bistrimaculata*, con un promedio de 10.439 granos de polen por avispa, fueron los que trasladaron menor cantidad de polen y se encontraron diferencias estadísticas con las abejas y las hembras de *C. bistrimaculata* ($p < 0.05$) (Figura 4.7).

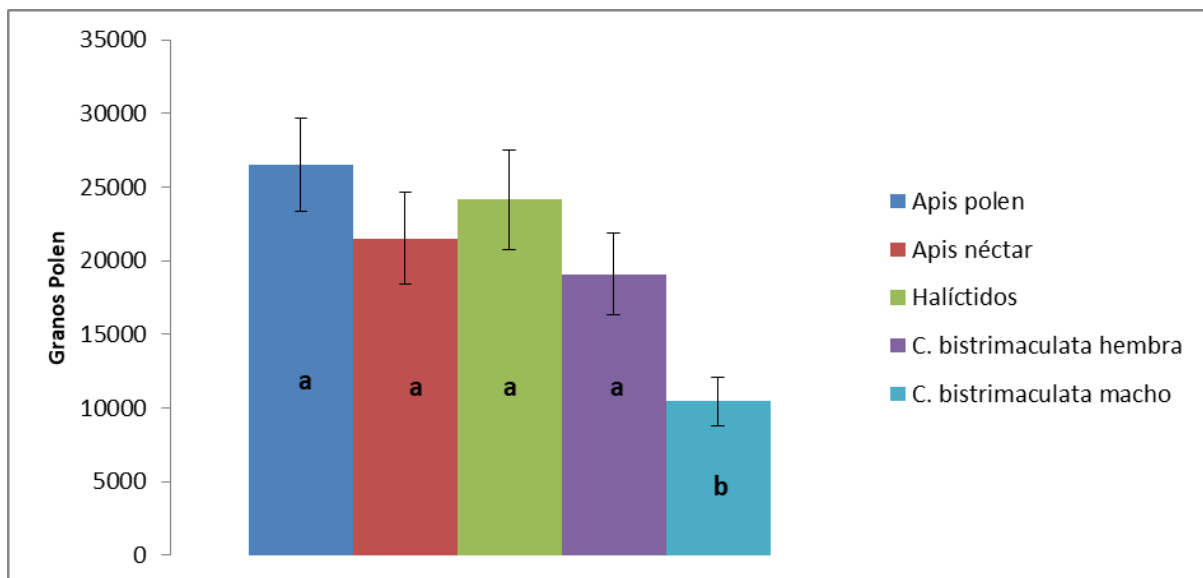


Figura 4.7: Número promedio de granos de polen registrados en los diferentes individuos de visitantes florales capturados sobre el cultivo de colza. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos analizados.

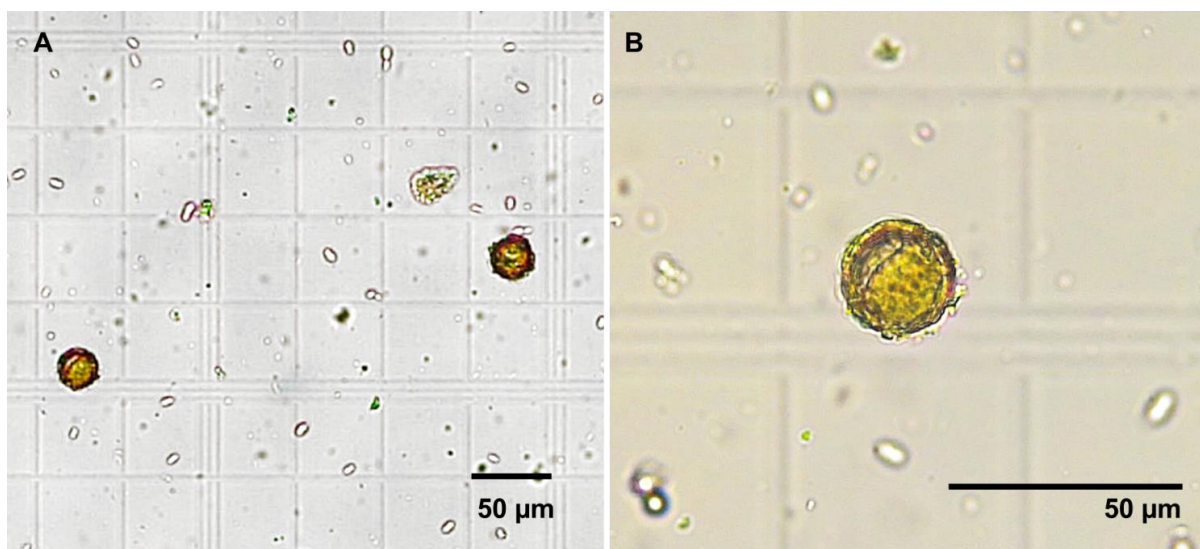


Figura 4.8: A: granos de polen de colza recolectados en individuos de *Campsomeris bistrimaculata* y contabilizados en la cámara de Neubauer. B: detalle del grano de polen.

La observación de varios ejemplares bajo la lupa confirmó que las especies estudiadas presentan el cuerpo completamente cubierto por pelos. Los halíctidos, al igual que *A. mellifera*, presentan pelos ramificados mientras que *C. bistrimaculata* tiene pelos simples. Los pelos ramificados permiten generar una mayor superficie de contacto y así retener el polen sobre el cuerpo de las abejas. A pesar de esto, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de polen que llevaban en el cuerpo las abejas y las hembras de *C. bistrimaculata*. En el cultivo de palta (*Persea americana*) Pérez-Balam *et al.* (2012) encontraron que la avispa *Brachygastra mellifica* transporta cantidades de polen similares a la abeja melífera. Si bien la información sobre las avispas como agentes polinizadores es escasa, estos resultados revalorizan a *C. bistrimaculata* como potenciales polinizadores de colza en el centro sur bonaerense.

Como se mencionó anteriormente, los halíctidos presentan escopas en su tercer par de patas. Estas estructuras con alta densidad de pelos, cortos y largos, cumplen un papel fundamental en el transporte de polen hacia el nido de cría. Debido a que éste no fue mezclado con secreciones salivales ni compactado, es apto para una posible fecundación de las flores (Parker *et al.*, 2015). La abundante pilosidad en el cuerpo de los halíctidos (incluidas las escopas), hace que, aunque presenten un menor tamaño corporal, trasladen gran cantidad de polen sobre su cuerpo y sean buenos vectores para la polinización de las plantas.

A. mellifera “néctar”, en su intensa actividad de pecoreo, inevitablemente tiene contacto con las estructuras reproductivas masculinas de la flor y su cuerpo se cubre de polen. Por lo tanto, cumplen un papel fundamental en la polinización de los cultivos. En esta especie, el polen que colectan es corbicular y, a diferencia del polen de las abejas con escopas, no se encuentra

disponible para la polinización (Parker *et al.*, 2015). Los resultados de este trabajo indican que, en un cultivo de colza convencional, el número promedio de granos de polen encontrados sobre el cuerpo de una abeja melífera que pecorea néctar es superior a 20.000 y no difiere significativamente del de una que pecorea polen, por lo que ambas son buenos agentes polinizadores. Según Philippe (1991), el número de abejas melíferas que pecorean polen es netamente inferior al de las recolectoras de néctar. Una cierta cantidad recolecta a la vez néctar y polen. En cifras generales, 10% de las abejas recolectan solamente polen, 25% néctar y polen y 65% néctar. Por lo tanto, las abejas pecoreadoras de néctar tendrían mayor incidencia como polinizadoras, dado que son mucho más abundantes que las que buscan polen (Fewell & Winston, 1992).

Los principales visitantes florales de colza del centro sur bonaerense transportan miles de granos de polen sobre su cuerpo (Figura 4.8). Aunque no se realizaron análisis específicos sobre eficiencia de polinización lograda por las diferentes especies, la abundancia de polen que transportan estas y su presencia en las flores de colza son claros indicios de su importancia como polinizadores. El tamaño corporal es un rasgo funcional importante que predice: rango de alimentación, tasa metabólica, termorregulación, supervivencia, fecundidad y puede desempeñar un papel fundamental en la eficiencia de los polinizadores (Greenleaf *et al.* 2007). Es posible que las grandes diferencias de tamaño entre los insectos analizados influyan en la cantidad de granos de polen que estos dejan en las flores de colza durante sus visitas. Autores como Garibaldi *et al.* (2013) concluyeron que los polinizadores silvestres depositan más polen en los estigmas por visita que la abeja melífera y que aquellos con cuerpos más grandes depositan significativamente más polen que los más pequeños.

Las observaciones directas permitieron corroborar que tanto el cuerpo de *C. bistrimaculata* como el de los ejemplares de la morfoespecie Halictidae, tuvieron contacto con las estructuras reproductivas de las flores de colza durante el pecoreo. En futuros estudios es necesario aplicar otras técnicas de muestreo para complementar los datos obtenidos, y así ampliar la información sobre la importancia de los polinizadores nativos.

Conclusiones

El tamaño de los visitantes florales del cultivo de colza en el sur bonaerense es muy variable y está asociado al taxón y al sexo de los individuos. Tomando la longitud de las alas de la abeja

melífera como referencia, la de los halíctidos mide en promedio la mitad, mientras que la de las hembras de *C. bistrimaculata* mide aproximadamente el doble.

El mayor tamaño de las hembras de *C. bistrimaculata* le permite trasladar una cantidad de granos de polen similar a la que transportan las abejas evaluadas, aun cuando la mayor parte de sus pelos no son ramificados. Los machos de *C. bistrimaculata* son de menor tamaño que las hembras de su especie y, a pesar de ser más grandes que las abejas, transportan significativamente menos polen en su cuerpo.

Capítulo 5: Efecto de la polinización entomófila sobre el rendimiento del cultivo de colza, *Brassica napus* L.

Introducción

Entre las especies de brasicáceas, la de mayor relevancia mundial es, sin dudas *Brassica napus* L. (colza, canola), ya que es la tercera oleaginosa en importancia a nivel mundial después de la palma y la soja (USDA, 2022). Esta especie, se destaca por su elevada participación en la producción mundial de aceites comestibles. Los principales países productores son la Unión Europea, Canadá, China, India y Australia (Iriarte, 2017), la mayoría de ellos también son grandes consumidores. El aceite de colza se emplea para consumo humano y como materia prima en la producción de biodiesel, además del uso de las harinas para la alimentación animal.

La región pampeana Argentina se caracteriza por presentar grandes extensiones aptas para el desarrollo de varios tipos de cultivos. El área ha registrado en los últimos años un proceso de intensificación de la producción agrícola que hace necesaria una rotación de cultivos adecuada para reducir la presión de plagas y enfermedades y mejorar las condiciones de almacenaje de agua y fertilidad. La inclusión de colza en esa rotación se presenta como una alternativa promisoriosa en los lugares donde las condiciones climáticas permiten solamente la realización de cereales de invierno (trigo, cebada, avena, etc.) (Iriarte & López, 2014). El centro sur de la provincia de Buenos Aires se destaca por presentarse como una zona muy apta para el desarrollo del cultivo de colza.

Si bien en el mundo se observa un incremento en la producción y consumo de colza, en la República Argentina no sucede lo mismo. Para el año 2020/21 se estimó una producción de 73,84 millones de toneladas (Mt), y se estima llegará a 83,14 Mt para la campaña 2022/23 (USDA 2022). A pesar de que en nuestro país existen condiciones agroclimáticas adecuadas para su cultivo, la producción de oleaginosas proviene mayormente de soja (*Glycine max* (L.) Merr) y girasol (*Helianthus annuus* L.) y de algunos otros cultivos como el maní (*Arachis hypogaea* L.). La colza es una oleaginosa invernal que pertenece a la familia Brassicaceae y al género *Brassica*, siendo las especies *B. napus* y *B. campestris* las más difundidas a nivel comercial. Los genotipos que se encuentran en el mercado argentino pertenecen a la especie *Brassica napus* (INTA Barrow, 1996).

En Argentina, el cultivo de colza se conoce desde 1930. Sin embargo, a pesar que presenta varios años de historia, la superficie sembrada no es estable. En la campaña 2012/2013, la producción local había mostrado un notable aumento, alcanzando 128.320 t. Esta tendencia no se sostuvo y, en la campaña 2020, se registraron 32.000 t (FAOSTAT, 2022). Actualmente la producción de colza en el país es de 46 mil toneladas (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina, 2023), con un rendimiento promedio de 1300 kg ha⁻¹ y 48% de aceite. Las principales zonas productoras de esta oleaginosa se ubican en el centro sur y sudeste de Buenos Aires y Entre Ríos (Figura 5.1). A diferencia de la mayoría de los cultivos oleaginosos, la colza es de ciclo invierno-primaveral, lo cual permite acceder al mercado en otra época del año e incrementar el abastecimiento de la industria. Además, al tratarse de un cultivo de climas templados a templados fríos, permite ampliar la región productora de oleaginosas, brindando un componente importante en la rotación agrícola (INTA Barrow, 1996).

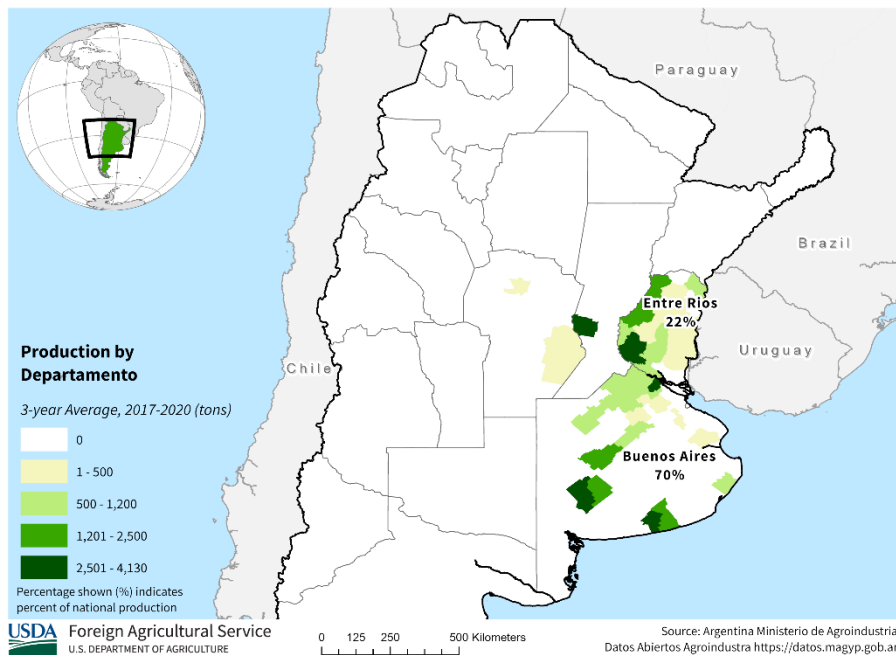


Figura 5.1: Distribución del cultivo de colza en Argentina en promedio para los años 2017 a 2020.

El efecto de la polinización entomófila en el rendimiento del cultivo de colza es un tema controversial y complejo. Los métodos utilizados para evaluar dicho efecto son diversos, rara vez comparables y muchas veces incompletos (Ouvrard & Jacquemart, 2018). Algunos estudios se realizan en pequeñas parcelas mientras que otros se desarrollan en campos de varias hectáreas (Westcott & Nelson, 2001; Stanley *et al.*, 2013). Las observaciones se llevan a cabo en invernaderos o en el campo (Willmer, 2011), en plantas “libres” o cubiertas con jaulas (Steffan-Dewenter, 2003; Pierre *et al.*, 2010). El rendimiento se evalúa a través de diferentes

parámetros (cuajado de frutos, cuajado de semillas, contenido de aceite de semillas, peso de semillas) en diferentes partes de las plantas (desde varias flores, hasta plantas enteras) o sobre el rendimiento total (toneladas por hectárea) (Free, 1993; Gallai *et al.*, 2009; Blochtein *et al.*, 2014; Bartomeus *et al.*, 2015; Krell *et al.*, 2018; Roubik *et al.*, 2018). También, el efecto de la polinización entomófila en un cultivo puede ser evaluado desde diferentes enfoques, desde las flores e insectos, registrando parámetros como el número de granos de polen transferidos por insecto por visita, la viabilidad del polen o el crecimiento del tubo polínico o, desde un punto de vista agronómico, como el rendimiento final que puede estimarse a escala de campo. Por lo tanto, se requiere una comparación de todos estos enfoques y métodos para proponer las formas más adecuadas.

Los métodos para determinar la influencia de la polinización entomófila en colza aún están en debate (Pierre & Renard, 2010; Carrington, 2013; Lindström *et al.*, 2015; Marini *et al.*, 2015; Garibaldi *et al.*, 2016; Potts *et al.*, 2016). Varios autores afirman la completa dependencia de la polinización por insectos, mientras que otros estiman que la dependencia fue muy baja debido al viento o a la autopolinización (Gallai, 2008; Witter *et al.*, 2014; Ouvrard *et al.*, 2017). Algunas investigaciones sugieren que el rendimiento en semilla está más limitado por la cantidad de polen que llega a cada flor que por su calidad; fenómeno ligado a la efectividad de los organismos que intervienen en el traslado de polen y a las condiciones climáticas (Chamer *et al.*, 2015; Chamer *et al.*, 2004). Es por esto que la participación de los polinizadores es esencial para la producción de semilla híbrida, donde el polen debe ser transportado desde las líneas androfértiles a los estigmas de las androestériles para lo que es indispensable una abundante secreción de néctar como atrayente para los insectos vectores.

El grado de autocompatibilidad en el cultivo de colza es variable y existen evidencias de que la polinización entomófila mejora el rendimiento (Morandin & Winston, 2005; Sabbahi, 2005; Bommarco *et al.*, 2012; Witter *et al.*, 2014; Mazzei, 2021). Se han reportado efectos benéficos de las abejas melíferas sobre el rendimiento de colza (Manning & Wallis, 2005; Sabbahi *et al.*, 2006). Algunos estudios destacan el papel de *Apis mellifera* L. como el principal polinizador de colza (Bommarco *et al.*, 2012; Woodcock *et al.*, 2016; Lindström *et al.*, 2018; Perrot, 2018), pero es sabido que otras abejas sociales, abejas solitarias, dípteros y lepidópteros también son considerados importantes polinizadores (Ali *et al.*, 2011; Rader, 2013; Witter *et al.*, 2014; Phillips, 2018). De hecho, existen interacciones entre las abejas melíferas y los polinizadores silvestres que impactan positivamente en la eficiencia de la polinización (Greenleaf & Kremen,

2006; Garibaldi *et al.*, 2014). Las abejas melíferas se destacan por presentar diferencias con algunos de los polinizadores silvestres, como son, el número de individuos en la población; características en su morfología (pelos ramificados sobre su cuerpo); sus hábitos alimentarios (polen y néctar) y su comportamiento (fidelidad floral en sus viajes de pecoreo), que las convierten en vectores muy eficaces del polen (Michener, 2007).

La apicultura es una actividad que, más allá de la producción de miel, brinda un importantísimo servicio a toda la comunidad a través de la polinización, y de allí su relevancia para la sustentabilidad de los sistemas agropecuarios. En la actualidad, el servicio de polinización de cultivos con *Apis mellifera* es una de las pocas herramientas con la que cuentan los productores agrícolas para garantizar una buena polinización de sus cultivos. Si bien en Argentina también se comercializa otra especie de abeja para la polinización de cultivos, *Bombus pauloensis*, se caracteriza por ser más conveniente en producciones hortícolas en invernaderos, tanto por su alto costo unitario por colonia como por sus características biológicas que se adaptan mejor a este tipo de cultivos.

La polinización entomófila en la colza puede aumentar el rendimiento del cultivo dependiendo del cultivar y la región de producción (Ouvrard & Jacquemart, 2018). La mayoría de los estudios fueron realizados en países europeos y en América del Norte; es poca la información sobre Argentina y Sudamérica (Adegas & Nogueira Couto, 1992; Ouvrard & Jacquemart, 2018; Mazzei *et al.*, 2021). En el centro sur y sudeste de la Provincia de Buenos Aires y este de La Pampa se producen colzas de tipo invernal y primaveral. En esta región, las temperaturas permiten cubrir los requerimientos de frío que necesita el cultivo para completar todas las etapas del desarrollo (Iriarte & Lopez, 2014).

La colza es una especie plástica, que puede compensar una baja población de plantas por unidad de superficie produciendo más ramas y frutos por planta (Rathke *et al.*, 2006; Iriarte & Valetti, 2008). El rendimiento puede estimarse como el producto del número de semillas por unidad de superficie y el peso promedio de las mismas, y puede evaluarse en parcelas experimentales de superficie conocida. La cantidad de silicuas por planta y el número de semillas por silicua son dos componentes del rendimiento que pueden verse afectadas por la presencia de polinizadores; no así la densidad de plantas, que se define previamente a la floración del cultivo. Otra variable de importancia económica en los cultivos oleaginosos es la variación del contenido de aceite. Hay discrepancias respecto a esta variable en las semillas de colza polinizadas por insectos respecto a las autofecundadas (Adegas & Nogueira Couto, 1992; Montaldo *et al.*, 1996).

Hay heterogeneidad entre investigadores respecto a cuáles son los componentes de rendimiento de la colza más influenciados por el ambiente y por las abejas. Algunos sostienen que el número de silicuas por planta es más importante (Thurling, 1974; Diepenbrock, 2000; Angadi *et al.*, 2003). Otros como Diepenbrock (2000) indican que el rendimiento depende de varios factores, ya que la colza tiene alta capacidad de compensación. Con el fin de contribuir con la preservación de los insectos polinizadores que forman parte de los agroecosistemas del centro sur bonaerense, se realizaron ensayos en parcelas de colza. Específicamente el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los polinizadores sobre el rendimiento y sus componentes, en cultivares de colza utilizados comúnmente en el centro sur de la provincia de Buenos Aires. Además, se evaluó el contenido de aceite en las semillas de colza correspondiente a los diferentes tratamientos de polinización.

Materiales y métodos

El rendimiento del cultivo de colza (*Brassica napus* L.) bajo el tratamiento de polinización libre y restringida fue evaluado en el centro sur bonaerense durante los años 2017, 2018 y 2019 en parcelas ubicadas en la Chacra Experimental Integrada Barrow (-38.319305, -60.239380). Los genotipos utilizados se eligieron según las características de los cultivares y las condiciones ambientales en el momento de la siembra en cada temporada. Se trabajó con un híbrido y una variedad en cada año de ensayo. En 2017 se tomaron muestras en dos cultivares de colza, Hyola 433 y Bioaureo 2486 (de ahora en adelante, Bioaureo), sembradas en parcelas de 1.75 m x 6 m. En 2018 se utilizaron Hyola 575 CL y Nuvette 2286 (de ahora en adelante, Nuvette), sembrados en parcelas de 2.56 m x 6 m. Por último, en 2019 se utilizaron los cultivares Hyola 830 y Macacha, sembrados en parcelas de 2.56 m x 6 m. El diseño experimental en el 2017 fue en bloques completos al azar con tres repeticiones y dos réplicas por bloque y en el 2018 y 2019 fue en bloques completos al azar con cuatro repeticiones y dos réplicas por bloque. Cada año se colocó un apiario de cuatro colmenas a 200 metros de las parcelas.

Las parcelas de ensayo se llevaron a cabo de forma convencional todos los años. Se realizaron labores con una rastra pesada y se sembró utilizando una densidad de 60-70 plantas/m², considerada adecuada para los cultivares primaverales. Previo a la siembra, se efectuó una fertilización de 60 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico y se aplicó trifluralina incorporada a razón de 1.5 l ha⁻¹ para el control de malezas. Cuando el cultivo se encontraba en roseta (4 hojas), se realizó una fertilización con 180 kg ha⁻¹ de urea y 70 kg ha⁻¹ de sulfato de amonio. También en

el estado de roseta se aplicaron 90 cc ha⁻¹ de dicamba combinado con 250 cc ha⁻¹ de clopiralid para el control de malezas.

La fecha de siembra se ajustó a las condiciones climáticas, especialmente las lluvias, y a las características propias de los cultivares utilizados. Se sembró el 5/6 y el 7/6 en 2017 y 2019, respectivamente. En 2018, la siembra se retrasó por exceso de lluvias hasta el 2/8. El inicio de la fecha de floración estuvo determinado por las características de los materiales, fecha de siembra y las condiciones climáticas propias de cada año.

Previo al inicio de la floración, una parte del cultivo se cubrió con jaulas excluidoras de insectos polinizadores (Figura 5.2). Las jaulas, de una superficie de 2 m² y 1.6 m de alto, se construyeron con caños plásticos y malla antiáfidos de polietileno de alta densidad (PEAD). Las jaulas fueron retiradas una vez finalizada la floración para minimizar su interferencia sobre el cultivo. De esta manera, se evitó el ingreso de insectos al momento de la polinización, se garantizó el desarrollo de los frutos y se estimó el aporte de la polinización entomófila al rendimiento.



Figura 5.2. Jaulas excluidoras de insectos polinizadores en el cultivo de colza en la Chacra Experimental Integrada Barrow.

El cultivo se cosechó cuando se encontraba en madurez fisiológica. Para determinar este momento, se utilizó la técnica descrita por el Canola Council of Canada (2013) que se basa en la observación del color de los granos. En primer lugar, se divide en forma vertical el tallo principal en tres sectores y se determina el color de las semillas. Cuando el cultivo se encuentra

en el momento óptimo de cosecha, en el tercio inferior las semillas (que han madurado primero) tendrán un color marrón pardo oscuro. En el tercio medio, el 90 % de las semillas será de color verde y el resto puede empezar a colorearse y tener un color marrón claro. En el tercio superior, la mayoría de las semillas serán de color verde y se presentarán firmes al hacerlas rodar entre los dedos.

Para la obtención de las muestras se arrojó al azar un cuadro de 0.25 m² dentro de cada parcela. Se contabilizó el número de plantas, el número de racimos y luego se cosechó todo el material de forma manual. Las muestras fueron embolsadas y trasladadas al laboratorio donde se realizaron las mediciones de los componentes de rendimiento. De cada muestra, se seleccionaron 20 racimos al azar y se determinó el número de silicuas con semillas, las silicuas que no produjeron semilla y la cantidad de flores que no produjeron silicuas. De cada uno de los racimos se seleccionó al azar una silicua y se determinó su largo y la cantidad de semillas (Figura 5.3). Una vez finalizados los conteos, las muestras fueron almacenadas bajo techo (temperatura y humedad ambiente) y trilladas individualmente. En 2017, las muestras fueron trilladas de forma manual; en 2018 y 2019 se utilizó una trilladora mecánica diseñada especialmente para muestras de ensayos; es decir, para volúmenes pequeños. El peso de 1000 semillas (P1000) fue determinado a través de un contador de semillas automático con lector láser. El porcentaje de humedad y materia grasa (en este trabajo se utilizan las expresiones “materia grasa” o “aceite” como sinónimos) fue determinado por el Laboratorio de Calidad Industrial de Granos de la Chacra Experimental Integrada Barrow. El método utilizado fue resonancia magnética nuclear (RMN); un método analítico no destructivo y rápido.



Figura 5.3. A. Silicuas de colza con semillas y, dentro del círculo, silicuas que no produjeron semillas. B. Restos de una flor sin fecundar. C. Medición de la longitud de una silicua con semillas.

El rendimiento de cada tratamiento se estableció pesando las semillas cosechadas en el área del cuadro de muestreo (0.25 m²), y expresando el valor en kilogramos por hectárea (Figura 5.4). Según Ouvrard & Jacquemart (2018), es la forma más conveniente de estimar el rendimiento para el cultivo de colza, ya que al ser una especie plástica el número de flores, frutos y semillas varían notablemente entre cultivares.



Figura 5.4. Cuadro de 0.25 m² para la obtención de las muestras de rendimiento y sus componentes.

El porcentaje de cuajado se define como el cociente entre el número de frutos llenos y el total de órganos reproductivos (Cantagallo, 2000). Este concepto ha sido utilizado para estudiar la eficiencia de generación de rendimiento (semillas o frutos) a partir del número total de flores desarrolladas en una inflorescencia, planta individual o en el cultivo. En este trabajo el porcentaje de cuajado se estableció a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de cuajado} = \left[\frac{\text{Silicuas con semillas}}{\text{Flores que no produjeron silicuas} + \text{Silicuas que no produjeron semillas} + \text{Silicuas con semillas}} \right] \times 100$$

Es decir, se determinó la proporción de silicuas que produjeron semillas con respecto al potencial máximo de la planta.

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza (ANOVA) y, en caso de detectar diferencias, las medias fueron comparadas mediante la prueba de LSD Fisher. Previamente se corroboró la homocedasticidad y normalidad de los grupos de datos. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). No se realizaron comparaciones entre los años de muestreo, ni comparaciones entre cultivares.

Resultados y discusión

Se discuten a continuación los resultados obtenidos en cinco cultivares a lo largo de tres años de ensayos. En 2019, debido al ataque de pulgones en las parcelas de la variedad Macacha, los datos no fueron representativos y no se realizaron los análisis estadísticos correspondientes.

Silicuas por planta

Al analizar el número de silicuas por planta contrastando los tratamientos de polinización sin restricciones (libre) vs. acceso restringido a los insectos, se observaron diferencias entre los materiales utilizados. Si bien el número de silicuas por planta en casi todos los ensayos fue mayor en los tratamientos con polinización entomófila, no en todos los cultivares se obtuvieron diferencias significativas (Figura 5.5). Nuvette y Hyola 575 presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) mientras que Hyola 433, Hyola 830 y Bioaureo no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) para esta variable.

En los cultivares Hyola 433 y Bioaureo, el número de silicuas por planta fue de solo un 2 % mayor cuando los insectos tuvieron acceso a las flores. Resultados similares fueron obtenidos por Chambo *et al.* (2014), quienes trabajaron con Hyola 433 en el sur de Brasil, y no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con polinización libre, polinización sólo con *Apis mellifera* y el tratamiento sin polinización entomófila (polinización restringida). Hyola 830 tampoco mostró diferencias significativas atribuibles a la polinización entomófila ($p > 0.05$). Otros cultivares utilizados en esta tesis, Hyola 575 y Nuvette, aumentaron el número de silicuas por planta en 18 % y 29 % respectivamente, mostrando diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de polinización libre y restringida. En la mayoría de la bibliografía consultada, el número de silicuas por planta aumenta con la polinización entomófila (Adegas & Nogueira Couto, 1992; Steffan Dewenter, 2003; Sabbahi *et al.*, 2005; Araneda, 2010; Chambó *et al.*, 2014; Aldemir & Unay., 2020). Steffan Dewenter (2003), registraron el doble de silicuas por planta en los tratamientos que tuvieron polinización entomófila. Otros autores, como Sabbahi *et al.* (2005), obtuvieron un incremento del 22 % en los tratamientos con polinización libre, resultados similares a los obtenidos en algunos cultivares estudiados en esta tesis.

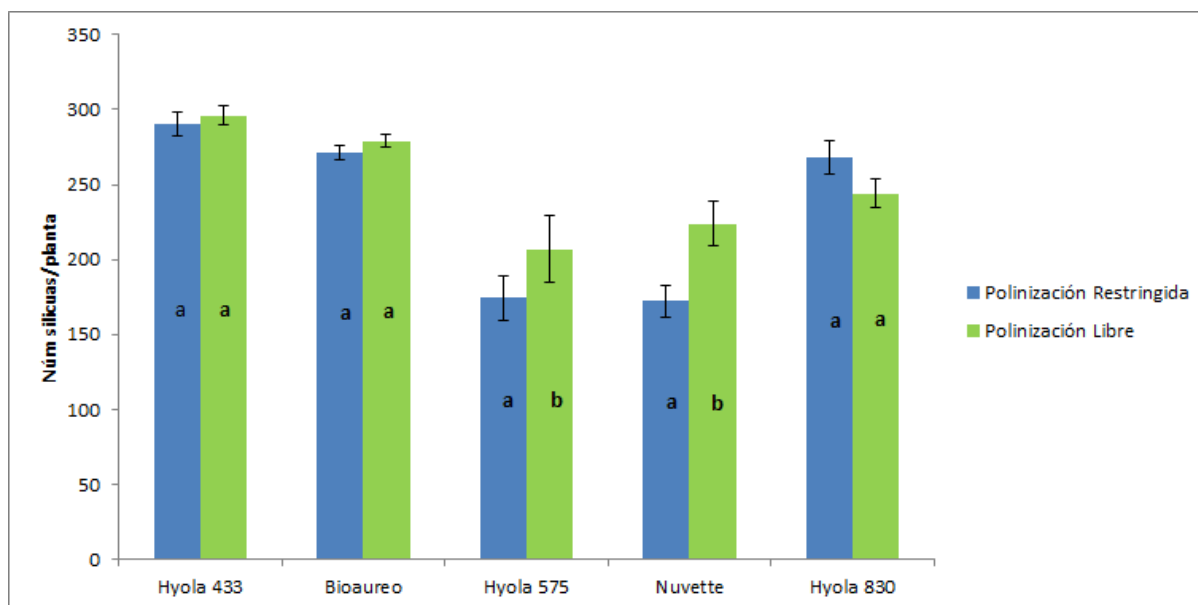


Figura 5.5: Número de silicuas con semillas por planta de colza en los tratamientos polinización libre y polinización restringida para los diferentes cultivares analizados. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos dentro de cada cultivar.

Longitud de las Silicuas

En la Figura 5.6, se presentan los resultados de las mediciones de la longitud que se realizaron a las silicuas en ambos tratamientos. Esta variable no representa un componente del rendimiento, sino que podría estar asociada a la cantidad de semillas que se generan en cada fruto. En este trabajo la diferencia a favor de silicuas más largas en los tratamientos de polinización libre sólo pudo ser demostrada en el cultivar Hyola 830 ($p < 0.05$). Dada la variabilidad de los datos, sería necesario contar con un gran número de repeticiones para poder confirmar si existen o no diferencias en otros cultivares. Barbier (1978) demostró que el crecimiento y la longitud de los frutos son mayores en las zonas del cultivo cercanas a las colmenas. También otros autores (Ewert, 1929; Meyerhoff, 1954; Koutensky, 1959), concluyeron que los frutos son más largos y contienen más semillas en los tratamientos con polinización de *Apis mellifera*.

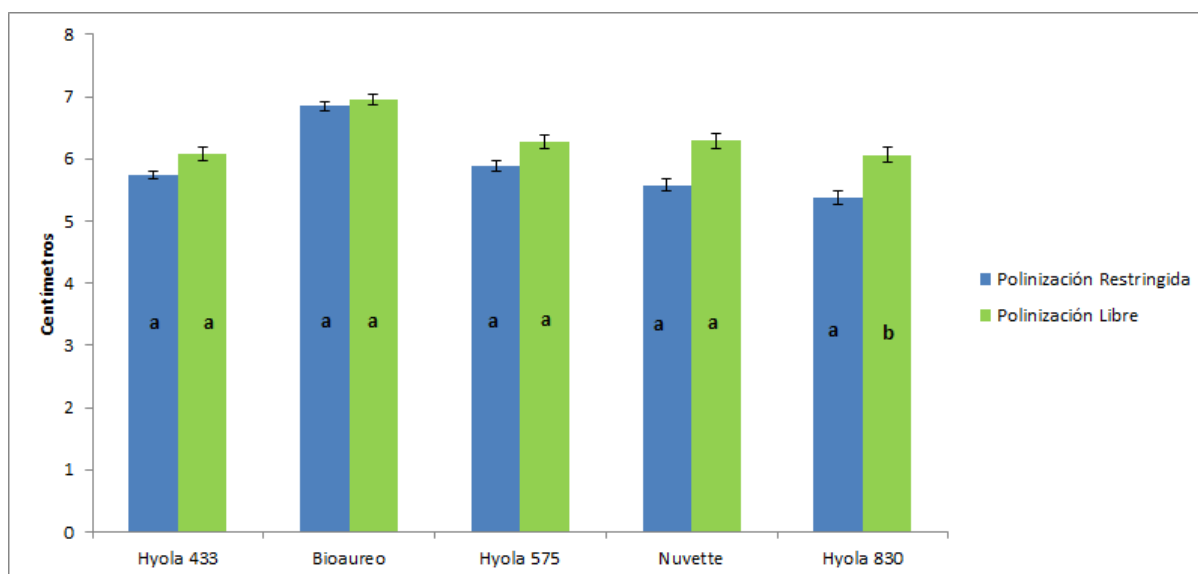


Figura 5.6: Longitud de las silicuas en los tratamientos polinización libre y polinización restringida para los diferentes cultivares de colza analizados. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos dentro de cada cultivar.

Porcentaje de cuajado

Como puede observarse en la Figura 5.7, el porcentaje de cuajado en el tratamiento con polinización libre fue significativamente mayor en tres de los cinco cultivares: Hyola 433, Hyola 575 y Nuvette ($p < 0.05$). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Sabbahi *et al.* (2005), quienes obtuvieron 61 % de cuajado en el tratamiento de autopolinización, 73 % en el tratamiento con una densidad de 1.5 colmenas ha^{-1} y 77 % con 3 colmenas ha^{-1} . En los cultivares Bioaureo y Hyola 830 no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) y el porcentaje de cuajado fue similar en ambos tratamientos.

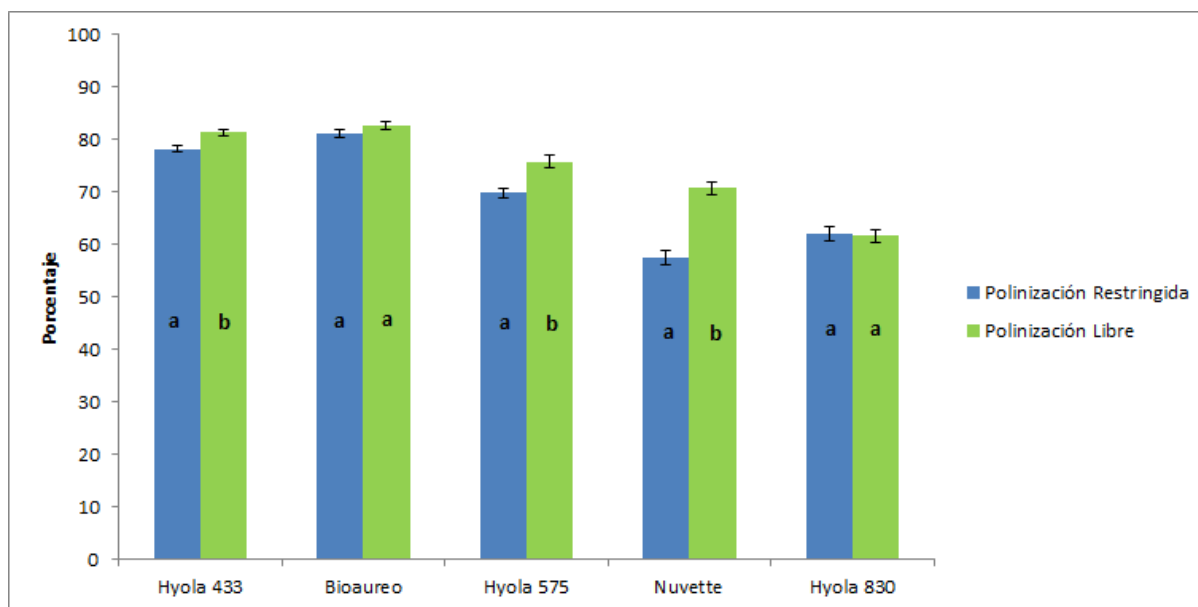


Figura 5.7: Porcentaje de cuajado en los tratamientos de polinización libre y polinización restringida para los diferentes cultivares analizados. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos dentro de cada cultivar.

Semillas/ Silicua

Los tratamientos con polinización entomófila produjeron significativamente más semillas por silicua ($p < 0,05$) (Figura 5.8). Estos resultados son acordes a los de Sabbahi (2005) y Williams *et al.* (1987), quienes reportaron que el número de semillas por silicua aumenta considerablemente en los tratamientos con polinización entomófila. Al germinar los granos de polen sobre la superficie del estigma, los tubos polínicos se elongan y descienden hacia los óvulos, fertilizándolos, lo que permite la formación de semillas en ambos carpelos del ovario. Este proceso depende de la calidad y la cantidad de granos de polen, si el número de granos de polen viables es menor que el número de óvulos la polinización será incompleta, y por lo tanto, no todos los óvulos producirán semillas (Mesquida & Renard, 1984).

Los cultivares Hyola 830 y Nuvette fueron los que presentaron las mayores diferencias, siendo el número de semillas por silicua un 62% y 55 % superior, respectivamente, cuando las flores fueron visitadas por insectos. La otra variedad utilizada, Bioaureo, presentó un aumento promedio del 17.5 % en el tratamiento de polinización libre. Los híbridos Hyola 433 y Hyola 575 aumentaron 24 % y 35 % respectivamente. Sabbahi *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares contando una media de 23 granos por silicua, con una densidad de tres colmenas por hectárea. Diferencias aún mayores fueron informadas por Steffan-Dewenter (2003), quien

concluyó que el número de semillas por silicua fue aproximadamente cinco veces mayor en experimentos con alta densidad de polinizadores en comparación con los controles.

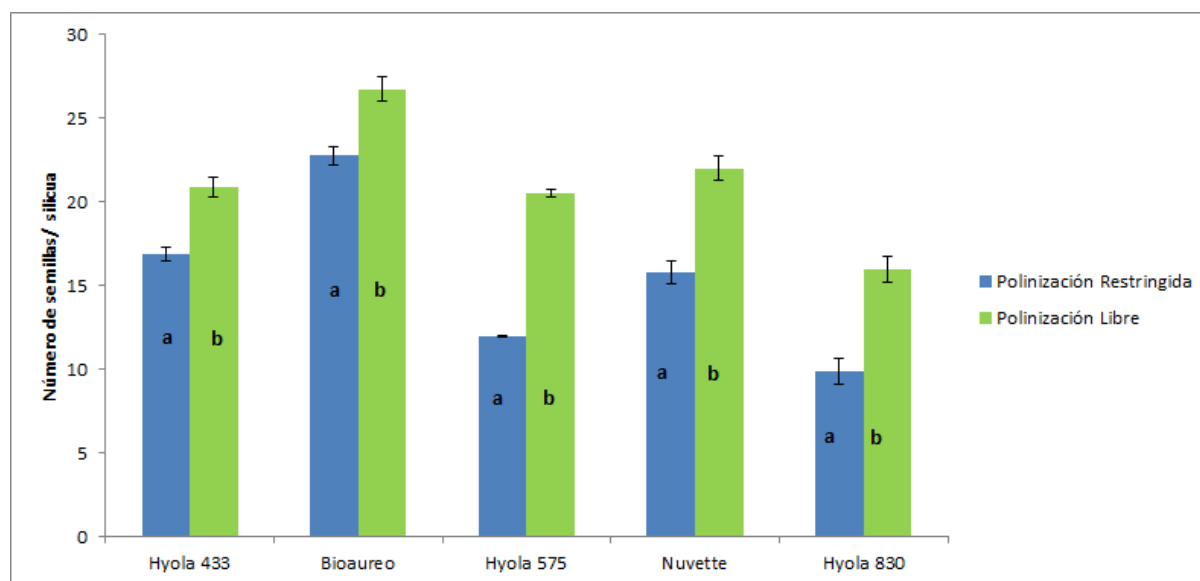


Figura 5.8. Número de semillas por silicua en los tratamientos polinización libre y polinización restringida para los diferentes cultivares analizados. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos dentro de cada cultivar.

Peso de 1000

En el presente trabajo no se encontraron diferencias estadísticas para ninguno de los cultivares analizados en cuanto al peso de 1000 semillas (Figura 5.9). Si bien varios autores (Sabbahi *et al.*, 2005; Manning & Wallis 2005; Araneda, 2010) concluyeron que el componente de rendimiento P1000 es mayor en los tratamientos sin polinizadores, este aumento de peso sería atribuible a una mayor disponibilidad de fotoasimilados para menor cantidad de semillas. Otros, como Bommarco *et al.* (2012) obtuvieron mayor peso individual por semilla en los tratamientos con polinización entomófila. Dada la variabilidad de los datos obtenidos en esta tesis, sería necesario contar con un mayor número de repeticiones para poder confirmar si existen o no diferencias entre tratamientos para los diferentes cultivares.

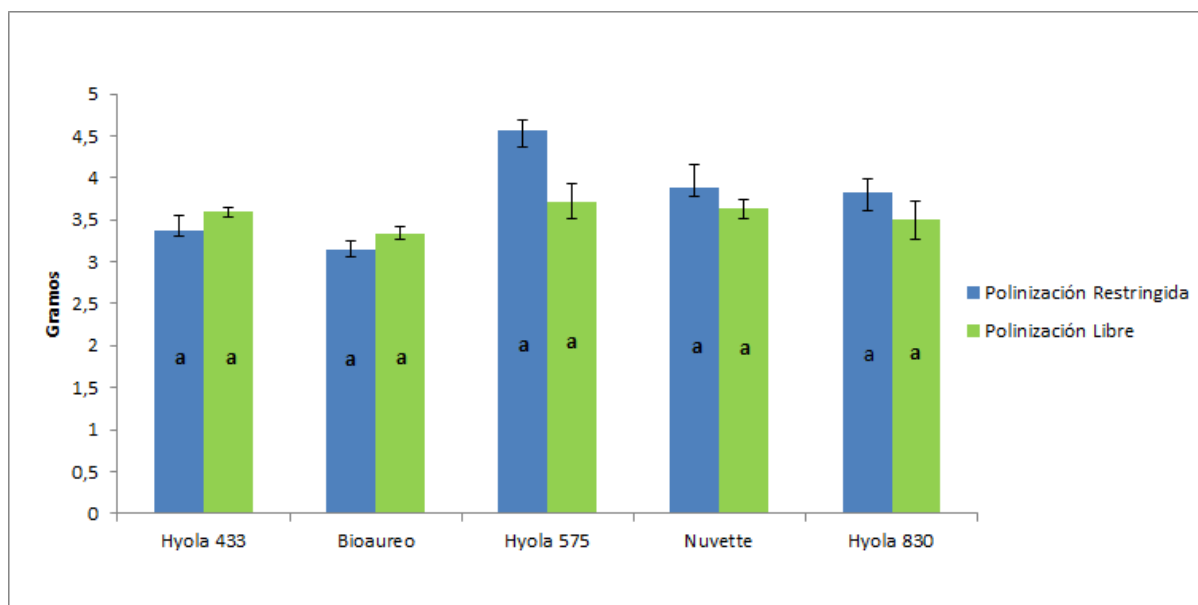


Figura 5.9: Peso de 1000 semillas en los tratamientos polinización libre y polinización restringida para los diferentes cultivares analizados. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos dentro de cada cultivar.

Porcentaje de Materia Grasa

Para la mayoría de los cultivares estudiados, se observó que el contenido de materia grasa tendía a ser algo superior con polinización entomófila, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (Figura 5.10). Resultados similares fueron encontrados por Langridge & Goodman (1982), quienes también obtuvieron un promedio mayor en el contenido de materia grasa en las semillas con polinización libre en comparación con los tratamientos de polinización restringida aunque este aumento no fue significativo.

La relación entre la polinización entomófila y el tenor de materia grasa difiere dependiendo del cultivo. Por ejemplo, en girasol (*Helianthus annuus*), la presencia de polinizadores aumenta significativamente el contenido de aceite en los cultivos (de Oliveira *et al.*, 2018). Esta diferencia entre especies puede deberse al proceso de obtención del aceite, ya que en el girasol se procesa todo el fruto, aunque el aceite se acumula en la pepita que botánicamente es la semilla. Cuando los capítulos no son visitados por insectos, se obtienen muchos frutos vacíos (o vanos) y, en la masa de grano, aumenta la relación cáscara/pepita, por lo que se obtiene menor rendimiento de aceite. En la colza sólo se procesa la semilla, ya que la cáscara del fruto o silicua se descarta en el proceso de trillado durante la cosecha.

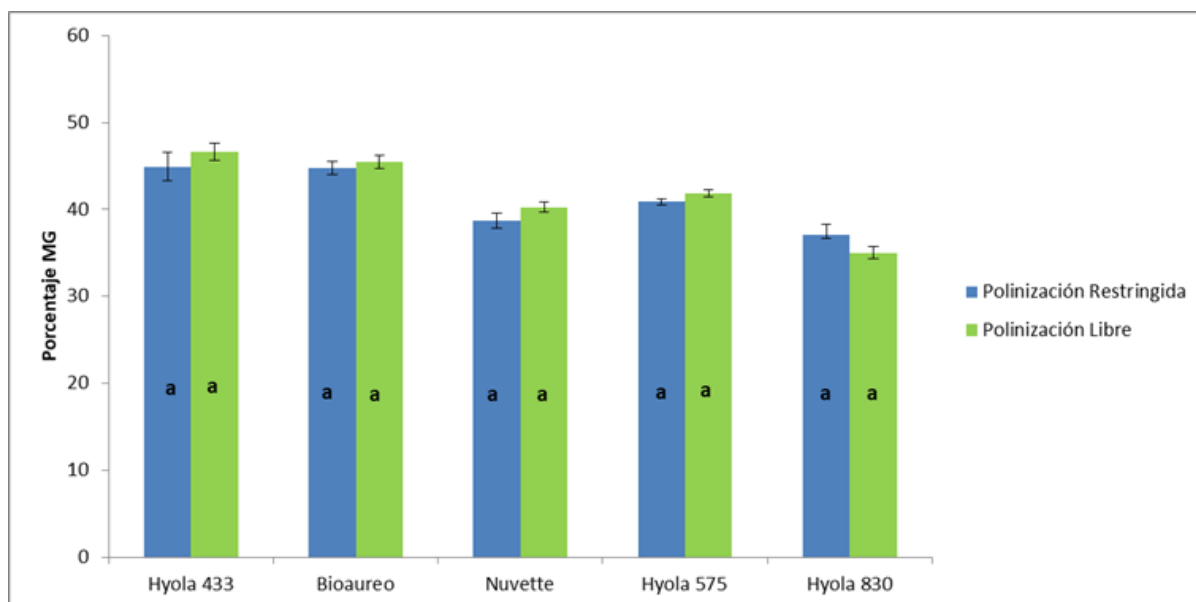


Figura 5.10: Porcentaje de materia grasa en los tratamientos polinización libre y polinización restringida para los diferentes cultivares analizados. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos dentro de cada cultivar.

Rendimiento

Dentro de las jaulas de exclusión de polinizadores (Polinización restringida) se produjo el cuajado de las flores a través del viento y la autopolinización. Los resultados de este trabajo mostraron, además, que el rendimiento del tratamiento Polinización libre aumentó significativamente debido al aporte de la polinización entomófila.

En todos los cultivares analizados, el rendimiento fue significativamente mayor cuando los insectos tuvieron acceso a las flores del cultivo (Figura 5.11). La diferencia entre tratamientos para los híbridos Hyola 433, Hyola 575 y Hyola 830 fue de un 27 %, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Resultados similares fueron obtenidos por Chambó *et al.* (2014) quienes trabajaron en el sur de Brasil con Hyola 433 y Hyola 61 obteniendo mayor rendimiento en los tratamientos con polinización libre y polinización con *Apis mellifera* en comparación con el tratamiento sin polinizadores. La variedad Bioaureo, al igual que los híbridos, presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), siendo un 30 % mayor el rendimiento con polinización libre. En la variedad Nuvette, también se obtuvieron diferencias estadísticas ($p < 0.05$); el tratamiento con polinización entomófila tuvo un aumento del 35 % en el rendimiento.

Al igual que los resultados de esta tesis, varios autores han reportado mejoras en el rendimiento de la colza debido a la presencia de insectos polinizadores, especialmente la de abeja melífera (Manning & Wallis, 2005; Sabbahi *et al.*, 2006; Araneda *et al.*, 2010; Chambó, 2014; Aldemir & Unay, 2020). Si bien todos coinciden con una mejora en el rendimiento, el grado de aumento a causa de los insectos polinizadores varía notablemente entre estos autores. Estas diferencias pueden deberse a la variabilidad entre los sitios donde se realizaron los ensayos y a los diferentes cultivares utilizados.

En los cultivos oleaginosos es usual calcular el rendimiento de materia grasa por unidad de superficie (Cheema *et al.*, 2001; Woittiez *et al.*, 2017). La importancia en la optimización del rendimiento en el cultivo de colza radica en que, como se detectaron diferencias significativas en el rendimiento de semillas y no en el tenor de materia grasa, la presencia de los polinizadores influyó en el rendimiento de materia grasa por hectárea a través de la primera variable mencionada.

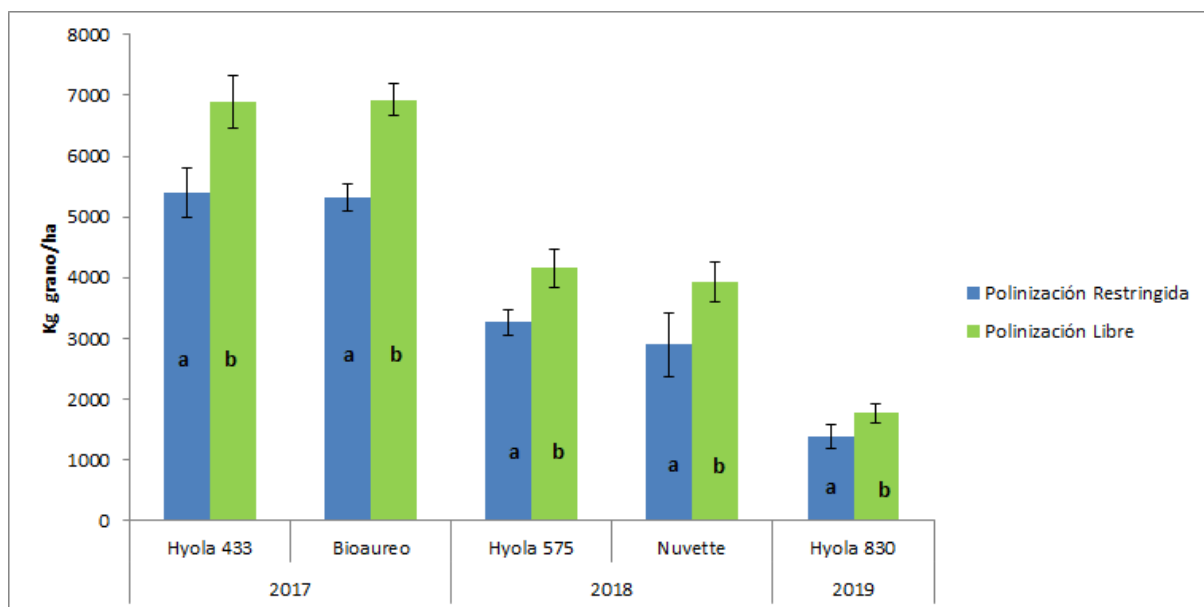


Figura 5.11: Rendimiento de grano de los tratamientos polinización libre y polinización restringida para los diferentes cultivares analizados. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos dentro de cada cultivar.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que la visita de insectos polinizadores en el cultivo de colza mejora la producción de semilla y esto se traduce en un mayor rendimiento.

Los cultivares estudiados mostraron diferentes estrategias de compensación para manifestar un aumento de la productividad por unidad de superficie frente a la presencia de insectos polinizadores.

Capítulo 6: Germinabilidad del polen de colza en colmenas de *Apis mellifera* L.

Introducción

En el ciclo de vida de las plantas, el polen viable es crucial para una eficiente reproducción sexual. Los granos de polen se producen en órganos especializados llamados estambres, que están compuestos por un tallo de tejido vascular y una antera de dos lóbulos donde se produce y almacena el polen. Una vez que los granos de polen están maduros, se produce la dehiscencia de la antera y son liberados al ambiente. Los vectores más comunes para el transporte del polen normalmente son el viento y varios tipos de insectos; esto depende de la especie vegetal. Cuando el polen alcanza un estigma compatible, forma el tubo polínico que crece a través de los tejidos del pistilo hacia el ovario para, finalmente, lograr la fecundación de los óvulos (Bots & Mariani, 2005).

Una característica especial de los granos de polen es su pared multicapa altamente resistente a la degradación y determinante para conservar la viabilidad; es completamente diferente de la pared de cualquier otra célula vegetal. En algunas especies, en la superficie de la pared, el polen presenta una capa de material conocido como trifina o polen kit (Taylor & Hepler, 1997). Esta sustancia pegajosa puede contener lípidos, proteínas y compuestos fenólicos y es importante en especies entomófilas.

Algunas de las funciones de esta cubierta son prevenir la desecación, atraer polinizadores y proteger contra la radiación UV; además, permite que se adhiera al cuerpo de los insectos para facilitar la transferencia, aunque los lípidos y las proteínas también juegan un papel importante para fortalecer la adhesividad entre el polen y el estigma (Dickinson *et al.*, 2000).

La productividad de las plantas cultivadas, especialmente aquellas en las que se cosecha el fruto, semilla o grano, tiene una alta correlación con la producción del polen y con su viabilidad. Dicha viabilidad puede ser fuertemente influenciada por condiciones ambientales sub o supra óptimas como sequía, calor y radiación solar (Shivanna *et al.* 1991; Khatun & Flowers, 1995; Sato *et al.*, 2002) lo que puede traducirse en una reducción en el cuajado de frutos y, por lo tanto, en el potencial del rendimiento. Está demostrado que esto sucede con la

exposición del cultivo de colza a altas temperaturas durante la floración (Angadi *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2004).

La producción de semilla híbrida de colza requiere como progenitor femenino una línea androestéril; por lo tanto, su fecundación es posible mediante la intervención de agentes polinizadores que transportan polen viable desde una línea androfértil (Delaplane, 2000; Westcott & Nelson, 2001). La productividad de la línea hembra, la producción de polen y el manejo de la sincronía de la anthesis 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 adecuadas para cada material. Uno de los riesgos en este tipo de producción, es la posible contaminación con polen de un progenitor masculino que no corresponde al cruzamiento deseado. Se sabe que, en la colza, la polinización cruzada disminuye a medida que aumenta la distancia entre la flor y la fuente de polen (Hüsken & Dietz-Pfeilstetter, 2007). Es por ello que, en la producción de semilla híbrida, se define cuidadosamente la distribución espacial de los lotes manteniendo una distancia razonable para que la línea androestéril no sea fecundada por el polen de un progenitor masculino ajeno (Westcott & Nelson, 2001). Normalmente, en este tipo de producciones se tiene en cuenta el traslado natural del polen, ya sea por el viento, agua, insectos, etc., y no el realizado por el ser humano de forma involuntaria. Algunos estudios muestran el período por el cual el polen mantiene la viabilidad cuando es trasladado por el viento (Timmons *et al.*, 1995; Pierre *et al.*, 2002).

A diferencia del traslado del polen realizado naturalmente, el movimiento del polen de forma antrópica ha sido muy poco estudiado. En el caso de la polinización entomófila, el tiempo que el polen permanece viable sobre el cuerpo de los insectos es un aspecto del que se tiene escasa información. Las colmenas dedicadas a la polinización para producción de semilla híbrida comúnmente se trasladan de un lote a otro del mismo cultivo. Eso implica un riesgo, ya que el polen presente en el interior de las colmenas y/o sobre las abejas podría contaminar la producción del nuevo lote, si las líneas androfértiles de los lotes sucesivos son diferentes. El polen en cuestión no es aquel que ya está procesado por las abejas (polen prensado o pan de abeja), sino el que queda como residuo sobre el cuerpo de las mismas o libre en la colmena y que podría ser trasladado a las flores después de haber estado expuesto a las condiciones ambientales de la colmena.

La producción de semilla híbrida de colza requiere de grandes cantidades de polinizadores en un periodo de tiempo relativamente corto; específicamente, durante la floración del cultivo. Los polinizadores nativos son altamente eficientes en el traslado de polen, pero su baja e impredecible densidad poblacional hace que, en este tipo de producción, se necesite la incorporación de polinizadores manejados por el ser humano. *Apis mellifera* L. es, sin dudas, la especie más utilizada a la hora de polinizar cultivos y la colza no es la excepción.

Según Westcott & Nelson (2001), la carga usada por las empresas productoras de semilla híbrida de colza en Canadá es de dos a cuatro colmenas (que contienen 10 marcos de cría cubierta por abejas) por hectárea. En la provincia de Buenos Aires generalmente se utiliza una carga de 6 colmenas por hectárea (comunicación personal Facundo Dagna Frommherz, 2016). Las colmenas se trasladan a los lotes de producción al comienzo del período de floración y se retiran inmediatamente cuando la misma finaliza. Canadá, uno de los principales productores de colza, además de *A. mellifera* utiliza, en menor medida, la abeja cortadora de hojas *Megachile rotundata* Fabricius como polinizador. Estas abejas son especialmente valiosas en lugares donde la distancia mínima de aislamiento requerida entre campos certificados y diferentes híbridos o variedades de polinización libre es de 1,6 km, ya que tienen menor rango de vuelo que la abeja melífera y así se previene la contaminación cruzada (Wescott & Nelson, 2001).

Si bien, la abeja melífera es una especie cosmopolita ciertas características de la colonia no se modifican, independientemente de las condiciones exteriores. Uno de los factores que es homogéneo en las colmenas, es la temperatura del nido de cría, dado que los estadios inmaduros de *Apis mellifera* requieren condiciones estables de temperatura para su normal desarrollo (Koeniger, 1978). Los adultos son los encargados de regular la temperatura constante de entre 32 y 36 °C en el nido de cría (Simpson, 1961; Crane, 1990; Fahrenholz, 1992; Bujok, 2002; Stabentheiner, 2010; Stalidzans, 2013). La regulación de la temperatura en el interior de la colmena es tan precisa que se establecieron relaciones entre las variaciones de la misma y el estado de desarrollo de la colonia.

En contraste con la temperatura, las abejas obreras tienen un control limitado sobre la humedad dentro de la colmena. La humedad óptima varía en distintas áreas del nido de cría y está sujeta a cambios en las condiciones ambientales externas. Además, las obreras dan prioridad a la regulación de la temperatura sobre la humedad, lo que implica que, al ajustar la temperatura, inevitablemente también se ven afectados los niveles de humedad (Human *et al.*, 2006).

Los granos de polen que ingresan a la colmena adheridos al cuerpo de las abejas están expuestos a las condiciones ambientales del interior. 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. El objetivo de este trabajo fue establecer el tiempo durante el cual el polen de colza mantiene su capacidad de germinar dentro de la colmena. Este estudio contribuirá a determinar el tiempo que habrá que esperar para trasladar una colmena de un lote de semilla híbrida de colza a otro lote con diferente progenitor masculino, sin correr el riesgo de contaminación.

Materiales y métodos

La germinabilidad *in vitro* del polen expuesto a condiciones ambientales de la colmena, se evaluó por medio de ensayos realizados en los años 2017, 2018 y 2019. Cada año se seleccionaron cuatro colmenas de *Apis mellifera* tipo Langstroth. A fin de lograr una mayor comodidad de trabajo se retiró uno de los 10 cuadros originales, dejando a cada colmena con nueve cuadros en total. Observando desde la parte posterior de la colmena, es decir el extremo opuesto a la piquera, se enumeraron del primero al noveno de los cuadros. Se colocaron sensores de temperatura y humedad (HOBO Onset H08-032-IS Registrador de datos de temperatura/HR 64K HOBO Pendant®) en distintas ubicaciones que registraron cada hora las condiciones ambientales. Los siete cuadros centrales, estaban ocupados mayormente por cría (operculada y abierta), y los dos laterales por reservas de miel y polen. Se tuvo en cuenta que no hubiera síntomas evidentes de enfermedades (varroasis, loque o nosemosis) y que la postura de la reina fuera abundante. Previo a la colocación de las muestras, se agregó un alza con cera labrada para estimular el crecimiento de la colmena y evitar la enjambrazón durante el ensayo.

Las muestras de polen se obtuvieron de plantas de colza (Hyola 433) cultivadas en macetas de 10 l. El momento con mayores posibilidades de obtener polen capaz de fecundar es inmediatamente después de la anthesis de la flor en la colza, ya que es el momento en que la capacidad de germinar es máxima (Mesquida, 1987). Atendiendo a este conocimiento fue que, una vez que la colza estuvo en floración, se etiquetaron pimpollos maduros (próximos a abrir). Al día siguiente a las 7:30 h (-3 GMT), se cosecharon las flores previamente marcadas, asegurándose de que tuvieran las anteras desarrolladas. Se extrajeron las anteras de todas las flores cosechadas formando una única muestra. En cada uno de 60 tubos Eppendorf de 0.5 ml,

se colocaron tres anteras al azar de la muestra tomada y, con una aguja histológica, se realizaron prensados mecánicos para romper los tejidos de las anteras y liberar los granos de polen. Una vez preparados, los tubos se colocaron abiertos para favorecer la exposición del polen a las condiciones del interior de las colmenas. Además, fueron sujetos por dos alfileres para evitar la rotación del tubo y que se cayera el polen con el movimiento de las abejas (Figura 6.1). Las muestras se colocaron en tres sitios del interior de la colmena: los cuadros 5, 7 y 9 (Figura 6.2).

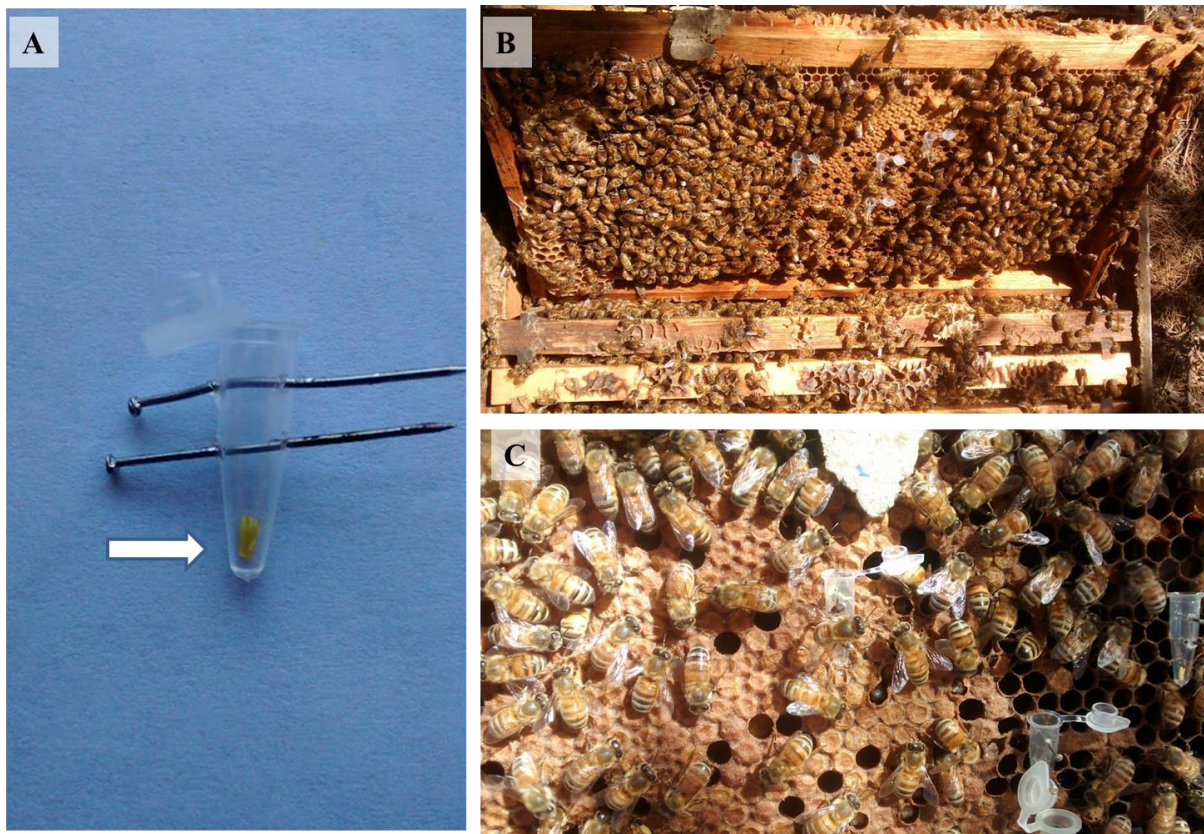


Figura 6.1: A: Tubo Eppendorf, sujetado con dos alfileres para evitar la rotación por el movimiento de las abejas, con polen de *Brassica napus*, la flecha indica la muestra de polen en el fondo del tubo; B: Muestras de polen dentro de una colmena de *Apis mellifera*; C: Muestras de polen en un cuadro de cría de *A. mellifera* (cuadro 5).

Antes de la colocación de las muestras en las colmenas, se analizó la germinabilidad de 12 muestras de polen recién cosechado; tratamiento denominado 0 h. Los 48 Eppendorf restantes, se colocaron de a cuatro en tres sectores diferentes dentro de cada colmena. Es decir, que en total se colocaron doce muestras por colmena. La primera posición fue en el cuadro central de la cámara de cría (cuadro 5), el cual se caracterizó por tener abundante cría. La segunda

ubicación consistió en una situación intermedia entre el extremo externo de la cámara de cría y el cuadro central de la misma (cuadro 7). Esta ubicación, se caracterizó por presentar cría en el centro del cuadro y reservas de miel y polen en los márgenes. La tercera posición fue en el extremo externo de la cámara de cría que se caracterizó por no presentar cría; solo había reservas de miel (cuadro 9) (Figura 6.2). Cada 24 h se retiró un tubo Eppendorf de cada cuadro de cada una de las colmenas; es decir, 12 tubos en total.

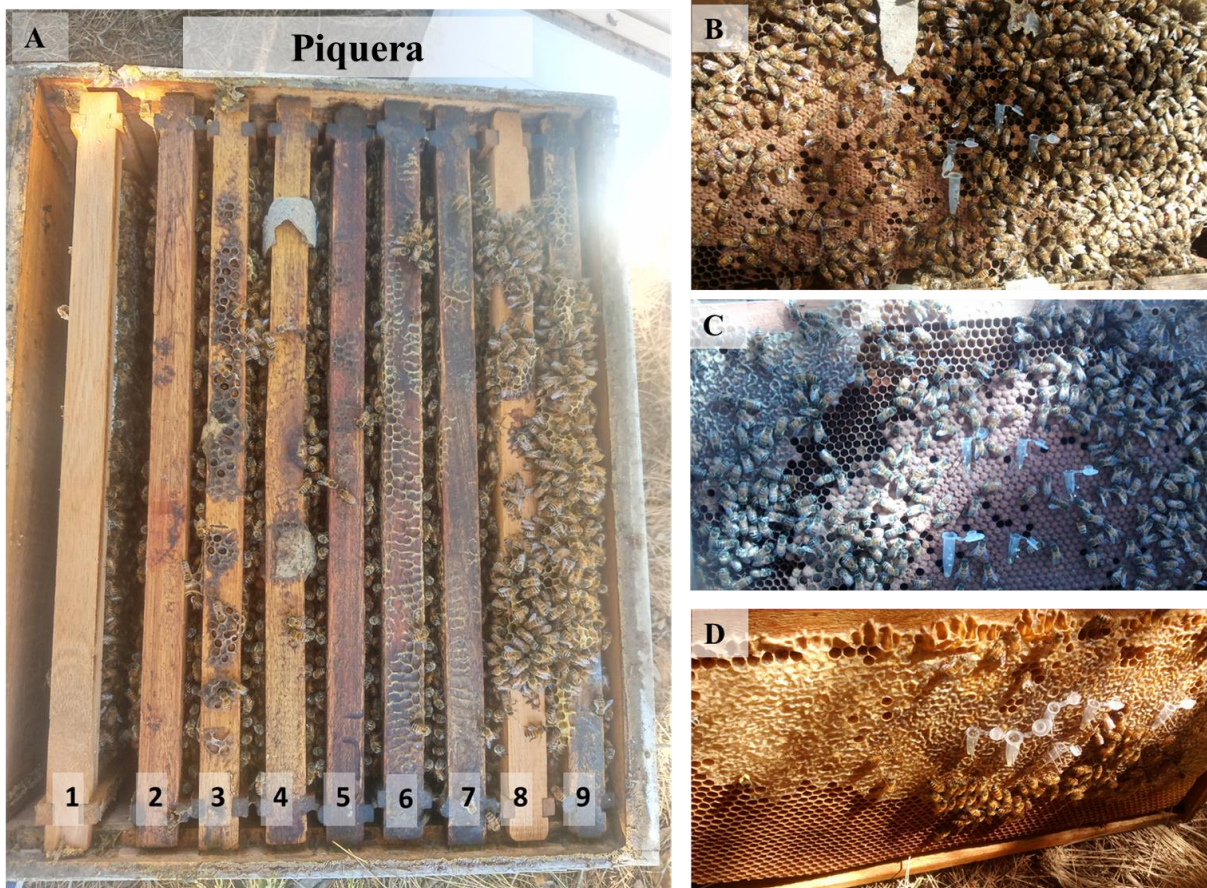


Figura 6.2: A: Identificación de los cuadros de una colmena de *A. mellifera* utilizada para el ensayo; B: Cuadro del centro de la cámara de cría, cubierto completamente por cría (cuadro 5); C: Cuadro compuesto por cría en el centro, miel y polen en los bordes (cuadro 7); D: Cuadro externo de la cámara de cría compuesto por reservas de miel (cuadro 9).

Para determinar el porcentaje de germinación del polen *in vitro*, se utilizó la técnica de la gota suspendida en cámara húmeda, descrita por Li *et al.* (2010). Consistió incubar los granos de polen de *Brassica napus*, en un medio nutritivo a 25 °C y 90 % de humedad relativa durante dos horas. Con un gotero, se colocó medio de cultivo en un portaobjetos y, sobre la gota, se colocaron las muestras de polen. El portaobjetos se colocó invertido (para dejar la gota suspendida) en cámara húmeda construida a partir de recipientes plásticos herméticos, con una

base de papel absorbente completamente humedecido. Una vez cumplidas las dos horas, se colocó un cubreobjetos sobre la gota para realizar el conteo de los granos de polen en microscopio óptico con un aumento de 400X. Por cada muestra, se contabilizaron 500 granos de polen y se estableció la relación entre los granos de polen germinados y los no germinados (expresada en porcentaje). Se consideraron germinados aquellos granos cuya longitud de tubo polínico era mayor que el diámetro del grano de polen (Li *et al.*, 2010).

El medio de cultivo utilizado para medir la germinabilidad *in vitro* del polen fue descrito para girasol por Astiz (2012). Se hizo un ensayo preliminar en el que se comprobó que también era adecuado para el polen de colza. El medio de cultivo estuvo compuesto por: 150 g/l polietilenglicol 6000 (PEG6000); 100 g/l sacarosa; 240 mg/l nitrato de calcio y 100 mg/l ácido bórico. El pH de los medios en todos los casos se mantuvo entre 6,5 y 7,0 y fue ajustado con cloruro de sodio 0.1 N. Se utilizó PEG6000 porque es relativamente inerte en el metabolismo del polen y no puede ingresar a las células (Read *et al.*, 1993). Por otro lado, se probó que su incorporación en el medio de cultivo genera un desarrollo superior del tubo polínico debido a que regula la permeabilidad de la membrana plasmática y brinda estabilidad a la membrana del tubo polínico (Read *et al.*, 1993). Este medio de cultivo fue preparado disolviendo el PEG6000 en agua destilada para luego añadir la sacarosa y, por último, el nitrato de calcio y el ácido bórico.

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza (ANOVA) y, en caso de detectar diferencias, las medias fueron comparadas mediante la prueba de LSD Fisher. Previamente se corroboró la homocedasticidad y normalidad de los grupos de datos. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Resultados y discusión

Las mayores temperaturas de la colmena se registraron en el cuadro 5, que estaba totalmente ocupado por la cría. El promedio de los registros de los tres años de ensayos fue 34.8 ± 0.8 °C. En este sitio la temperatura es la más estable de las registradas y el valor es consistente con lo reportado por otros autores (Southwick & Heldmaier, 1987; Seeley, 1995; Jones *et al*, 2004). El cuadro 7 estaba cubierto por cría en el centro del cuadro y reservas de miel y polen en los márgenes; allí las temperaturas registradas tuvieron un promedio 32.8 ± 1.8 °C. A diferencia de lo ocurrido en las áreas de cría, en las zonas con reservas de miel y/o polen, cuadro 9, las temperaturas fueron menores y más variables: 24.9 ± 4.1 °C como lo indica el desvío estándar. A modo de ejemplo, se presentan en la Figura 6.3 los registros de temperatura en los diferentes sitios de una colmena durante la temporada 2018.

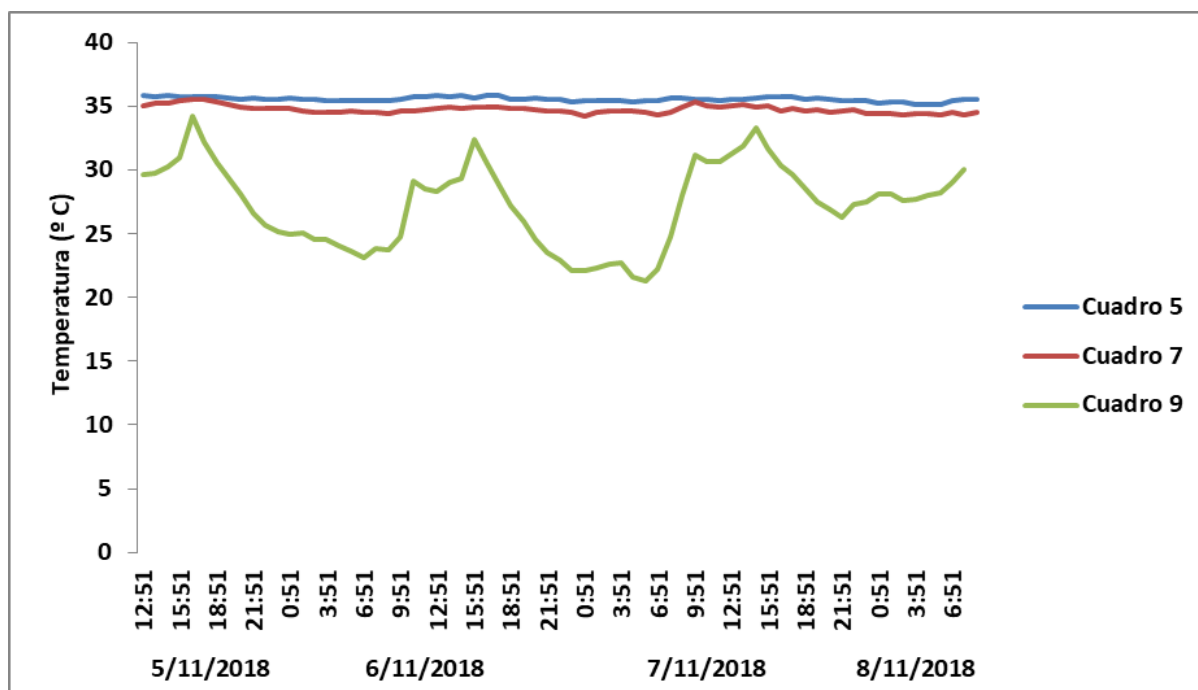


Figura 6.3: Variación de la temperatura dentro de una colmena experimental, en las áreas de cría y las áreas de reservas de miel y/o polen (-3 GMT).

La humedad relativa dentro de la colmena no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre las áreas con cría y las áreas con reservas de miel y/o polen a lo largo de los tres años de ensayos ($p > 0.05$). En la Figura 6.4 se presentan, a modo de ejemplo, los registros de humedad relativa en los diferentes sitios de la colmena durante la temporada 2018.

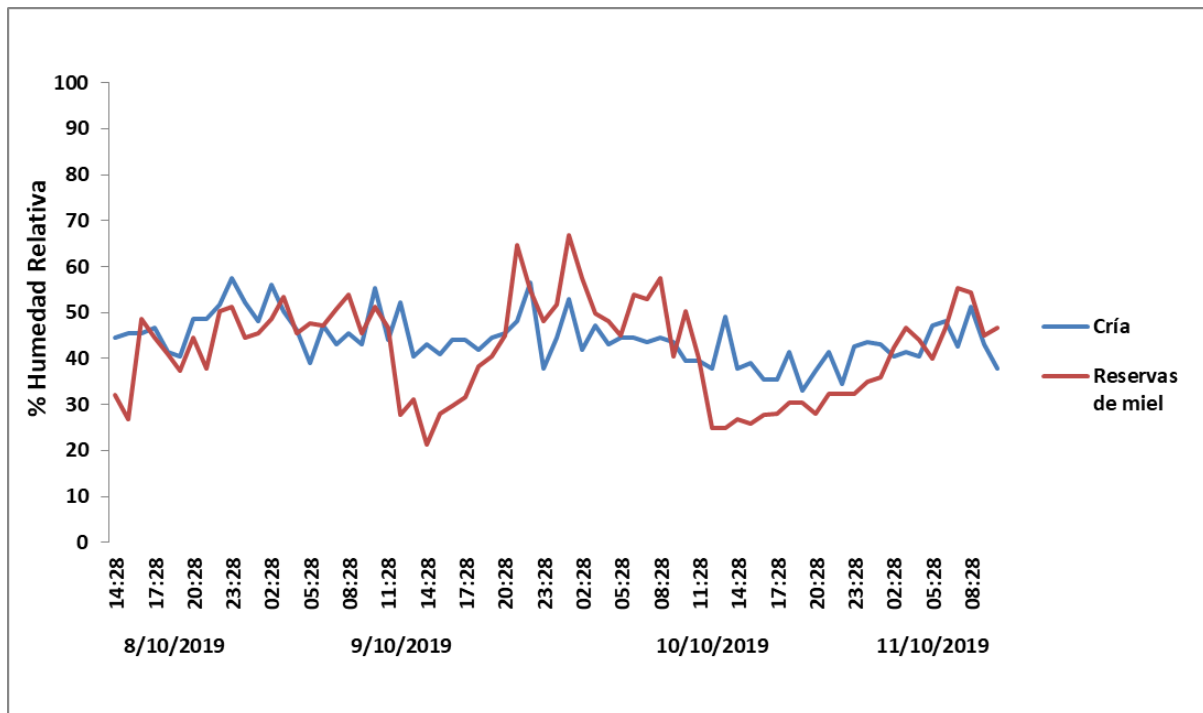


Figura 6.4: Variación de la humedad relativa dentro de una colmena experimental, en las áreas de cría y las áreas de reservas de miel y/o polen (-3 GMT).

En todos los años de ensayos, los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron con el polen fresco recién retirado de las flores; es decir, durante el tiempo de 0 h. Los resultados muestran que las condiciones ambientales del interior de la colmena afectaron la germinabilidad del polen de colza; los granos ubicados en las áreas de cría perdieron la capacidad de germinar luego de 24 horas. No se encontraron diferencias estadísticas en la germinabilidad entre los cuadros 5 y 7, los cuales estaban mayormente compuestos por cría ($p > 0.05$). El polen ubicado en áreas con reservas de miel y/o polen, cuadro 9, conservó su capacidad de germinar por más tiempo en comparación con el que se ubicó en los cuadros con cría ($p < 0.05$) (Figura 6.5). En esta última ubicación, en el margen de la colmena, se registraron granos de polen que conservaron la capacidad de germinar hasta 48 horas posteriores a su entrada en la colmena. En todos los casos, el porcentaje de germinación del polen luego de 48 h en el interior de la colmena fue $< 20\%$. La última medición se realizó 72 h luego de haber colocado el polen en la colmena y todas las muestras arrojaron 0% de germinación.

La temperatura no sólo afecta a los granos de polen durante su transporte desde la antera y hasta la germinación en el estigma, sino también durante el desarrollo en la antera (Morrison, 1993; Sato *et al.*, 2002). Por ejemplo, en especies como algodón (*Gossypium hirsutum*), maíz (*Zea mays*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) temperaturas superiores a los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el

período de emisión del polen, pueden afectar su viabilidad (Mitchell & Petolino 1988; Reddy *et al.* 1992; Peet *et al.* 1998; Sato *et al.*, 2002; Kakani *et al.* 2005; Degrandi-Hoffman & Chambers, 2006); lo cual puede traer como consecuencia una disminución en la fecundación. Según Morrison (1993), temperaturas mayores a 27 °C en preantesis reducen la fertilidad del polen de colza. Morrison (2016) concluyó que en la mayoría de las variedades de colza analizadas se redujo significativamente la germinabilidad del polen y la longitud de los tubos polínicos cuando este germinaba a 33 °C. Por lo tanto, los resultados de esta tesis coinciden con lo expuesto anteriormente, ya que la temperatura en las áreas de cría se mantuvo cercana a 35 °C.

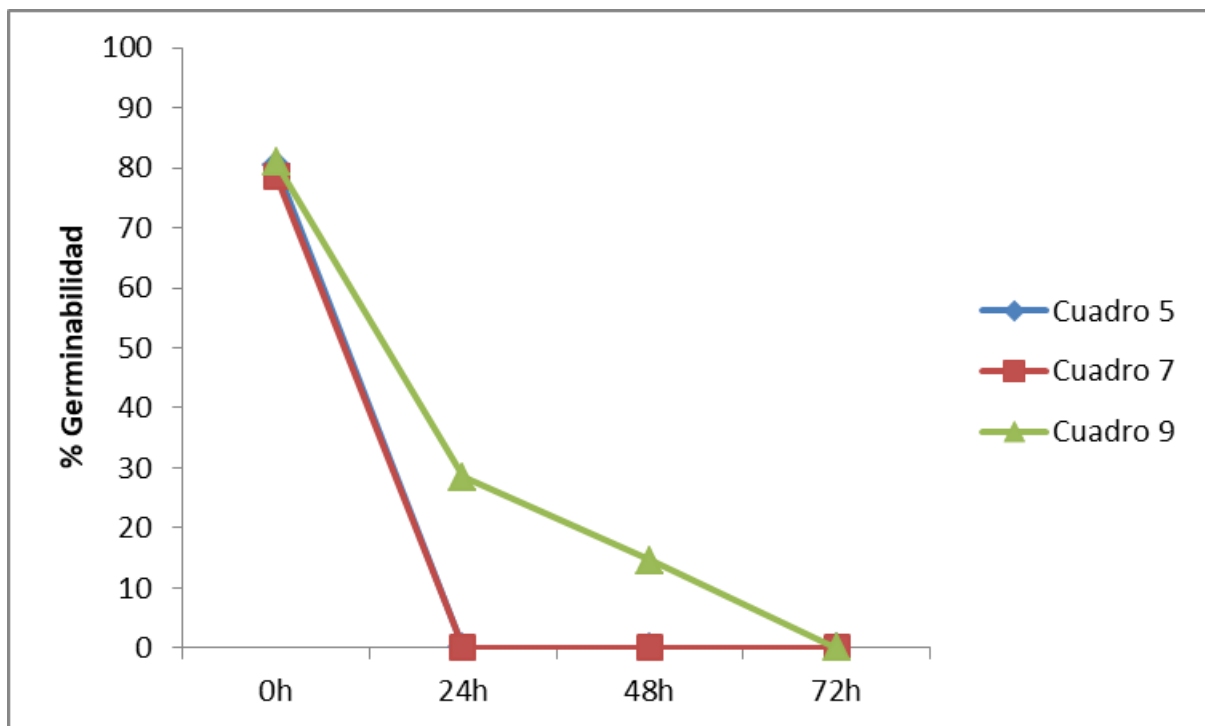


Figura 6.5: Germinabilidad *in vitro* de los granos de polen de colza luego de permanecer en diferentes ubicaciones dentro de una colmena de *A. mellifera*. La curva correspondiente al cuadro 5 se superpone con la del cuadro 7.

Como se mencionó anteriormente, los cuadros más externos de la cámara de cría están sujetos a variaciones de temperatura más amplias que los cuadros centrales. Esta influencia de las condiciones ambientales exteriores se debe a que normalmente los cuadros externos de la cámara de cría tienen reservas de miel y/o polen y las abejas no ejercen un control estricto de la temperatura como lo hacen en los cuadros con cría. A lo largo de los tres años de ensayos, las temperaturas promedio en el cuadro 9 fueron 24.6 ± 3.8 °C, 27.3 ± 3.2 °C y 22.7 ± 4.0 °C, en los años 2017, 2018 y 2019 respectivamente. A pesar de estas diferencias, la germinabilidad

del polen se redujo sustancialmente a las 48 horas de introducido en la colmena (Figura 6.6). La capacidad de germinabilidad del polen resultó nula a las 72 horas.

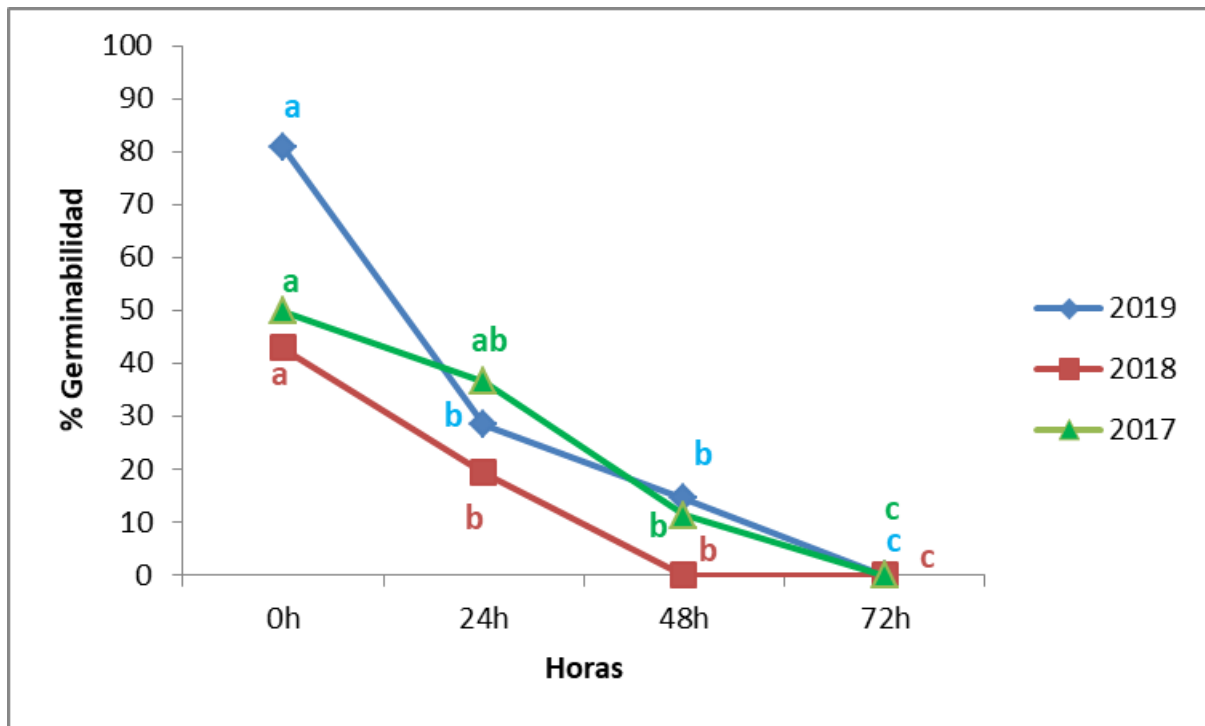


Figura 6.6: Porcentaje de germinabilidad de los granos de polen ubicados en el cuadro 9 en los años 2017, 2018 y 2019. Letras iguales dentro de la curva correspondiente a cada año indican que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

El polen fresco presentó tubos polínicos más gruesos y con mayor desarrollo. Los granos de polen que habían pasado 24 h dentro de la colmena desarrollaron tubos polínicos más finos, más cortos y convolutados. Por último, las muestras de polen que habían permanecido 48 h dentro de la colmena, presentaron tubos polínicos atrofiados (Figura 6.7). Estos resultados son similares a los publicados por Young *et al.* (2004), quienes concluyeron que los tubos polínicos germinados a 35 °C presentaron un crecimiento anormal, eran más finos y cortos que los cultivados a 23 °C. Estas malformaciones en los tubos polínicos podrían interferir en la correcta fertilización de los óvulos y, aún en caso de prosperar, estarían en gran desventaja respecto a los granos de polen frescos del lote de producción de semilla de colza.

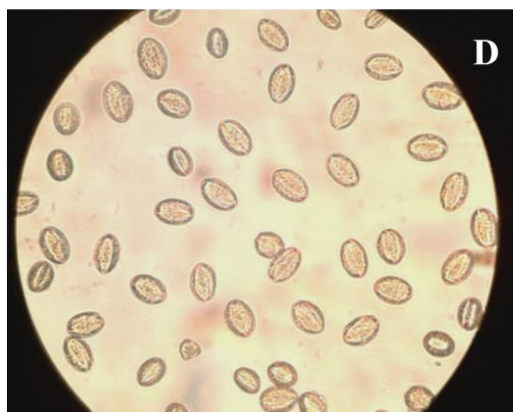
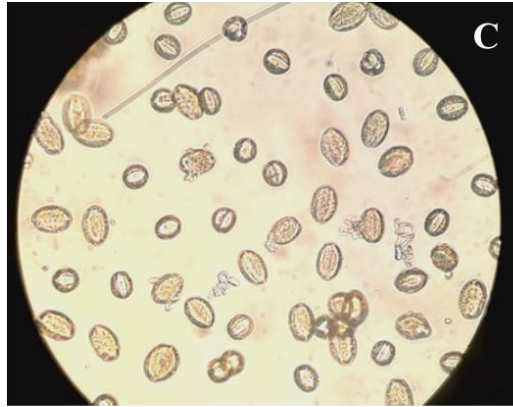
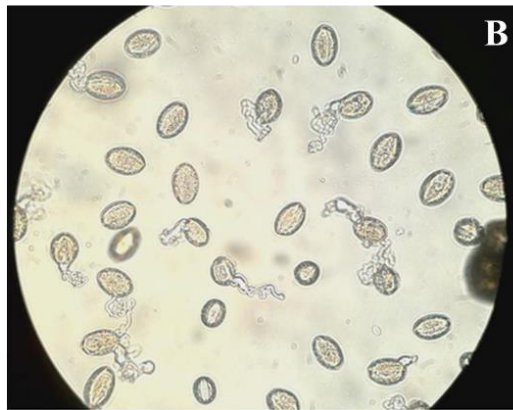
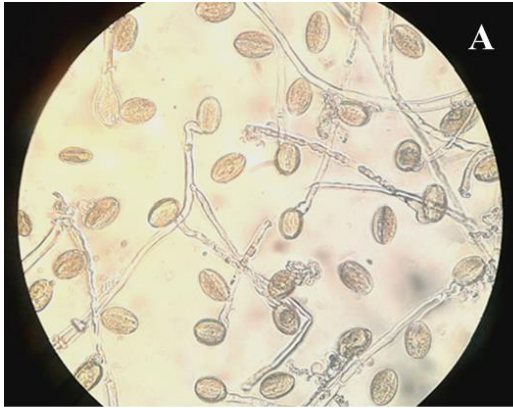


Figura 6.7: Desarrollo de los tubos polínicos de granos de polen de colza luego de diferentes períodos de tiempo en el interior de una colmena de *A. mellifera* (400X). A: 0 h ; B: 24 h; C: 48 h; D: 72 h.

Conclusiones

Este estudio demuestra que las condiciones ambientales dentro de la colmena de *Apis mellifera* son adversas para la germinabilidad de los granos de polen de colza, independientemente de las condiciones ambientales externas. Aquellos granos que estuvieron en el área de cría pierden su capacidad de germinar luego de su exposición a las condiciones de la colmena por 24 h; por lo tanto, el riesgo de contaminar la producción de semilla del nuevo lote en el que son emplazadas es extremadamente bajo. Las condiciones del interior de la colmena no sólo afectaron el porcentaje de germinación del polen de colza, sino también el desarrollo de los tubos polínicos.

En el caso de granos de polen que hubiesen permanecido alejados de las áreas de cría, donde las temperaturas son menores y más variables, su capacidad de germinar se mantuvo por más tiempo. En este caso, para evitar el riesgo de contaminación, la colmena deberá permanecer por lo menos 72 horas fuera del nuevo lote de producción.

Estos estudios son el puntapié inicial para conocer el riesgo de que las colmenas de *Apis mellifera* pudieran transportar polen viable y así contaminar lotes de producción de semilla híbrida de colza. Sería conveniente realizar otros estudios para confirmar el tiempo de espera necesario para movilizar una colmena de un lote a otro.

Consideraciones finales y perspectivas

El cultivo de colza ha recibido la atención de muchos investigadores de diversas regiones del mundo; sin embargo, algunos aspectos relevantes de la polinización no encontraron respuesta en base a la documentación bibliográfica. La información obtenida sobre la diversidad de visitantes florales de la colza y de algunas especies emparentadas es propia del centro sur de la provincia de Buenos Aires (República Argentina), pero no por ello es poco relevante ya que los polinizadores son un eslabón clave para la sustentabilidad de los agroecosistemas.

Un tema que genera debate, también relacionado con la polinización entomófila, es su incidencia sobre el rendimiento de la colza. Por tratarse de un cultivo de enorme importancia económica en el mundo, la presión de mejoramiento ha ido modificando el grado de autocompatibilidad de los genotipos comerciales de colza; esto generó gran variabilidad en los resultados de los trabajos científicos que abordan el tema. Este estudio brindó información sobre la influencia de la abeja melífera y de los polinizadores silvestres sobre los componentes de rendimiento y la producción de granos de algunos genotipos actualmente utilizados en el centro-sur de la región Pampeana. Por otro lado, se necesitaron nuevos estudios para conocer la cantidad de granos de polen que transportan los insectos polinizadores, y el tiempo de supervivencia de los granos de polen dentro de las colmenas, información que resulta válida en cualquier contexto.

Los ensayos realizados durante el periodo 2015 - 2019 permitieron aceptar las hipótesis planteadas. A pesar de la pérdida de biodiversidad documentada a nivel mundial como consecuencia del aumento de la actividad agrícola, en la zona de estudio se comprobó que numerosas especies de insectos, de diversas familias y órdenes, visitaron el cultivo de colza.

Del trabajo realizado se desprende la importancia de la utilización de diferentes métodos de muestreo para cuantificar e identificar visitantes florales. Las trampas de agua permitieron capturar gran cantidad de especies de insectos. A pesar de esto, fueron menos eficientes en las capturas de *Apis mellifera* y abejorros. El método de observación directa determinó que la abeja melífera es el polinizador de colza más abundante. La utilización de ambos métodos complementarios permitió la obtención de resultados más representativos de la entomofauna presente.

De las especies de himenópteros capturadas, la abeja melífera es la única introducida. A través de la observación directa, se corroboró su intensa actividad pecoreadora tanto de néctar como de polen. La densidad de abejas melíferas varía en los agroecosistemas, ya que en muchas

ocasiones los apicultores trasladan sus colmenas a polinizar ciertos cultivos o en busca de nuevas floraciones para maximizar los rindes de los productos de la colmena. Aun cuando se encontraban altas densidades de la abeja melífera en las parcelas de colza, se observó actividad normal de los visitantes florales nativos.

Los datos registrados aportaron información valiosa sobre el grupo de visitantes florales que se encontraban pecoreando el cultivo de colza. El conocimiento previo respecto a las especies de insectos que visitan los cultivos en la zona de estudio es escaso, y este trabajo permitió identificar, a lo largo de tres periodos de floración, los principales grupos que se encuentran en el centro sur de la provincia de Buenos Aires.

Las zonas con vegetación espontánea aledañas a las parcelas de colza presentaron una floración más extensa, brindando recursos a los visitantes florales antes, durante y después de la floración del cultivo. Estas zonas cumplen un rol fundamental en el desarrollo de las poblaciones de insectos benéficos. Al igual que en el cultivo de colza, en los parches de especies espontáneas se registraron numerosos órdenes de visitantes florales; de hecho, todas las especies capturadas se encontraron tanto en el cultivo como en las malezas aledañas. Esto indica que los insectos utilizan ambos recursos. Como era de esperarse, la abundancia de las poblaciones de visitantes florales silvestres resultó variable en los diferentes años de muestreo.

La gran diversidad de visitantes florales identificados es un estímulo para implementar prácticas de manejo que favorezcan el aumento y el fortalecimiento de estas poblaciones. Estos insectos favorecen la polinización no sólo de los cultivos sino también de otras plantas entomófilas que garantizan la sustentabilidad de los diferentes agroecosistemas. En el centro sur bonaerense se encuentran visitantes florales de diferentes tamaños polinizando el cultivo de colza, y todos ellos trasladan un gran número de granos de polen en los pelos de su cuerpo, superior a 10 000 granos por individuo en cualquiera de los grupos estudiados. La diversidad morfológica influye en el transporte de polen. Las diferencias morfológicas entre abejas y avispa podrían hacer suponer que este último grupo es menos eficiente en el transporte de polen de colza. No obstante, el mayor tamaño de las hembras de *C. bistrimaculata* compensó la ausencia de pelos ramificados, dado que no se detectaron diferencias en la cantidad de polen adherido en el cuerpo con respecto a las especies de abejas analizadas. Se corroboró que los machos de *C. bistrimaculata* son de menor tamaño que las hembras y trasladan menor cantidad de polen.

Los resultados de este trabajo muestran que la visita de insectos polinizadores en el cultivo de colza mejora la producción de semilla. Esto se traduce en un mayor rendimiento que, en definitiva, es el objetivo de todo productor. La colza es altamente plástica, con gran capacidad de compensación, dada por sus estructuras reproductivas como ramas, flores o semillas por silicua. Frente a la presencia de insectos polinizadores, los cultivares estudiados mostraron diferentes respuestas de los componentes de rendimiento para aumentar la producción por unidad de superficie.

La polinización entomófila mejoró el rendimiento en todos los cultivares analizados, aun cuando el nivel de aumento no fue homogéneo. Estos resultados llevan a considerar que cada productor podría, contando con más información al respecto, evaluar el interés de contratar un servicio de polinización dependiendo del cultivar, el contexto agroclimático y el precio del servicio. La visita de los polinizadores mejoró la cantidad de semilla y no generó variaciones significativas en el tenor de materia grasa, con lo cual el aumento de rendimiento de semilla tuvo implicancia directa sobre la producción de aceite por hectárea.

Se demostró que el estudio de la germinabilidad de los granos de polen de colza que permanecieron dentro de la colmena es importante particularmente para los apicultores que realizan servicio de polinización y para las empresas semilleras que contratan este servicio. En los contratos, estas empresas exigen que las colmenas no hayan estado en un cultivo de la misma especie vegetal por una cantidad de días previos al comienzo del servicio. Esto significa un largo tiempo de espera, complicaciones de índole logística para los apicultores y menor disponibilidad de colmenas para los semilleros, ya que reduce la posibilidad de que con una misma colmena se puedan realizar dos servicios de polinización en variedades de un mismo cultivo con diferente fecha de floración. Se demostró que las condiciones ambientales dentro de la colmena de *Apis mellifera* son adversas para la germinabilidad de los granos de polen de colza, independientemente de las condiciones ambientales externas. Las zonas de cría son las de mayor temperatura y en 24 h no se registraron granos de polen con capacidad de germinar. El polen alejado de las zonas de cría perdió su capacidad de germinar en menos de 72 h. Para evitar el riesgo de contaminación, alcanza con que la colmena permanezca, por lo menos, 72 horas fuera del nuevo lote de producción, ya que, a partir de las 48 h la capacidad de germinabilidad del polen disminuye significativamente y el bajo porcentaje que germina presenta tubos completamente atrofiados. Los resultados de este trabajo respaldan una reducción sustancial del tiempo de carencia que exigen las empresas semilleras y abren la posibilidad de que se utilice una misma colmena en dos servicios de polinización.

Bibliografía

Abrahamovich, A. H., Díaz, N. B., & Lucía, M. 2007. Identificación de las "abejas sociales" del género *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) presentes en la Argentina: clave pictórica, diagnosis, distribución geográfica y asociaciones florales. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 106(2), 165-176.

Abrol, D. P. 1988. Environmental factors influencing pollination activity of *Apis mellifera* on *Brassica campestris*. *Journal of the Indian Institute of Science*, 68(1&2), 49-52.

Abrol, D. P. 2007. Honeybees and rapeseed: a pollinator–plant interaction. *Advances in botanical research*, 45, 337-367.

Adegas, J. E. B., & Nogueira Couto, R. N. 1992. Entomophilous pollination in rape (*Brassica napus* L. var *oleifera*) in Brazil. *Apidologie*, 23(3), 203-209.

Agüero, J. I., Rollin, O., Torretta, J. P., Aizen, M. A., Requier, F., & Garibaldi, L. A. 2018. Impactos de la abeja melífera sobre plantas y abejas silvestres en hábitats naturales. *Ecosistemas*, 27(2), 60-69.

Aguirre Wibmer, M., & Uriarte Puppo, I. 2010. Respuesta del cultivo de colza-canola (*Brassica napus*) a las condiciones físico-químicas del suelo a nivel de chacra. Tesis de grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Pp 59.

Aizen M. A. & 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: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.071>

Aizen, M. A. & Feinsinger, P. 1994a. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology*, 75(2), 330–351.

Aizen, M. A. & Feinsinger, P. 1994b. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honey bees in Argentine Chaco Serrano. *Ecological Applications*, 4(2), 378–392.

Aizen, M. A., Aguiar, S., Biesmeijer, J. C., Garibaldi, L. A., Inouye, D. W., Jung, C., Martins, D. J., Medel, R., Morales, C. L., Ngo, H., Pauw, A., Paxton, R. J., Sáez, A., & Seymour, C. L. 2019. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence

without a parallel increase in crop diversification. *Glob. Change Biol*, 25(10), 3516-3527. <https://doi.org/10.1111/gcb.14736>

Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A. & 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.

Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M. 2008. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current biology*, 18(20), 1572-1575.

Albrecht, M., Schmid, B., Hautier, Y., & Müller, C. B. 2012. Diverse pollinator communities enhance plant reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1748), 4845-4852. DOI:10.1098/rspb.2012.1621

Aldemir, M. & Unay, A. 2020. The preliminary study on effects of pollinating insects in canola (*Brassica napus* L.) production. *ANADOLU, J. of AARI*, 30 (2), 245-250. DOI: 10.18615/anadolu.834983

Ali, M., Saeed, S., Sajjad, A., & Whittington, A. 2011. In search of the best pollinators for canola (*Brassica napus* L.) production in Pakistan. *Applied Entomology and Zoology*, 46, 353-361.

Allen-Wardell, G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J., Allen Cox, P., Dalton, V., Feinsinger, P., Ingram, I., Inouye, D., Jones, E., Kennedy, K., Kevan, P., Koopowitz, H., Medellin, R., Medellin-Morales, S., Nabhan, G., Pavlik, G., Tepedino, V., Torchio, P., & Walker, S. 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology*, 12 (1), 8-17.

Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A., & Kellogg, E. A. 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259, 89-120.

Altieri, M. A., & Nicholls, C. I. 2004. *Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems*. CRC Press. Haworth Press, New York. Pp 252. ISBN: 978-1560229230

- Anderson, B., Pauw, A., Cole, W. W., & Barrett, S. C. H. 2016. Pollination, mating and reproductive fitness in a plant population with bimodal floral-tube length. *Journal of Evolutionary Biology*, 29, 1631–1642. <https://doi.org/10.1111/jeb.12899>
- Anderson, B., Terblanche, J. S., & Ellis, A. G. 2010. Predictable patterns of trait mismatches between interacting plants and insects. *BMC Evolutionary Biology*, 10 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-204>
- Andersson, G. K. S., Rundlöf, M., & Smith, H. G. 2012. Organic Farming Improves Pollination Success in Strawberries. *PLoS ONE* 7(2): e31599. DOI:10.1371/journal.pone.0031599
- Andrada, A. C., & Tellería, M. C. 2005. Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from south of Caldén district (Argentina): botanical origin and protein content. *Grana*, 44(2), 115-122.
- Angadi, S. V., Cutforth, H. W., McConkey, B. G., & Gan, Y. 2003. Yield adjustment by canola grown at different plant populations under semiarid conditions. *Crop Science*, 43(4), 1358-1366.
- Angadi, S. V., Cutforth, H. W., Miller, P. R., McConkey, B. G., Entz, M. H., Brandt, S. A., & Volkmar, K. M. 2000. Response of three *Brassica* species to high temperature stress during reproductive growth. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(4), 693–701. <https://doi.org/10.4141/P99-152>
- Araneda Durán, X., Breve Ulloa, R., Aguilera Carrillo, J., Lavín Contreras, J., & Toneatti Bastidas, M. 2010. Evaluation of yield component traits of honeybee-pollinated (*Apis mellifera* L.) rapeseed canola (*Brassica napus* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(2), 309-314.
- Astiz, V. 2012. Biología polínica, fecundación y rendimiento en dos genotipos híbridos de girasol (*Helianthus annuus* L.) alto oleico. Tesis de Magíster. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 80.
- Astiz, V., & 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.

Bailey, S., Requier, F., Nusillard, B., Roberts, S. P., Potts, S. G., & Bouget, C., 2014. Distance from forest edge affects bee pollinators in oilseed rape fields. *Ecology and Evolution*, 4(4), 370-380.

Bajiya, M. R. & Abrol, D. P. 2017. Flower-visiting insect pollinators of mustard (*Brassica napus*) in Jammu Region. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 2380-2386. P-ISSN: 2349-8234. Consultado en septiembre del 2022 <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue5/PartAI/6-5-326-506.pdf>

Barbier, E. 1978. Pollinisation du colza par les abeilles, *Rev. Fr. d'Apic*, 365, 288-291.

Barth, F. G. 1991. *Insects and flowers: the biology of a partnership*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. Pp 408.

Bartomeus, I., Gagic, V., & Bommarco, R. 2015. Pollinators, pests and soil properties interactively shape oilseed rape yield. *Basic Appl. Ecol.* 16(8), 737–745. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2015.07.004>.

Batáry, P., Baldi, A., Sarospataki, M., Kohler, F., Verhulst, J., Knop, E., Herzog, F., & Kleijn, D. 2010. Effect of conservation management on bees and insect-pollinated grassland plant communities in three European countries. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 136(1-2), 35-39.

Benedek, P., & Prenner, J. 1972. Effect of temperature on the behaviour and pollinating efficiency of honeybees on winter rape flowers. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, 71(1-4), 120-124.

Blaauw, B. R., & 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.

Blochtein, B., Nunes-Silva, P., Halinski, R., Lopes, L. A., & Witter, S. 2014. Comparative study of the floral biology and of the response of productivity to insect visitation in two rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.) in Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Biology*, 74(4), 787-794.

Blüthgen, N., & Klein, A. M. 2011. Functional complementarity and specialisation: the role of biodiversity in plant–pollinator interactions. *Basic and applied ecology*, 12(4), 282-291.

- Bommarco, R., Marini, L., & Vaissière, B. E. 2012. Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape. *Oecologia*, 169(4), 1025-1032.
- Borror, D. J., DeLong, D. M., & Triplehorn, C. A. 1989. An introduction to the study of insects. 6th edition. Saunders. USA.
- Bots, M. & Mariani, C. 2005. Pollen viability in the field. COGEM report, Radboud Universiteit Nijmegen, Netherlands. Pp 52. https://library.wur.nl/WebQuery/file/cogem/cogem_i00000021_001.pdf
- Breeze, T. D., Vaissière, B. E., Bommarco, R., Petanidou, T., Seraphides, N., Koza, L., Scheper, J., Biesmeijer, J. C., Kleijn, D., Gyldenkerne, S., Moretti, M., Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Stout, J. C., Pärtel, P., Zobel, M., & Potts, S. G. 2014. Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS ONE* 9(1): e82996. DOI:10.1371/journal.pone.0082996
- Brosi, B. J. & Briggs, H. M. 2013. Single pollinator species losses reduce floral fidelity and plant reproductive function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), 13044-13048.
- Buffington, M. L., Garretson, A., Kula, R. R., Gates, M. W., Carpenter, R., Smith, D. R., & Kula, A. A. 2021. Pan trap color preference across Hymenoptera in a forest clearing. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(3), 298-311.
- Bujok, B., Kleinhenz, M., Fuchs, S., Tautz, J. 2002. Hot spots in the bee hive. *Naturwissenschaften*, 89: 299–301. DOI 10.1007/s00114-002-0338-7
- Calabuig, I. 2000. Solitary bees and bumble bees in a Danish agricultural landscape. PhD Thesis, University of Copenhagen, Zoological Institute, Denmark. Pp 103.
- Calderone, N. W. 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators, and US Agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PLoS ONE* 7(5): e37235. DOI:10.1371/journal.pone.0037235
- Cane, J. H., Minckley, R. L., & Kervin, L. J. 2000. Sampling bees (Hymenoptera: Apiformes) for pollinator community studies: pitfalls of pan-trapping. *Journal of the Kansas entomological society*, 225-231.

Cane, J.H., 1987. Estimation of bee size using intertegular span (Apoidea). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 60(1), 145-147.

Canola Council of Canada. 2023. Canola Encyclopedia: Canola Growth Stages. Consultado en febrero del 2023, de <https://www.canolacouncil.org/canola-encyclopedia/growth-stages/#canola-growth-stage-6-flowering-including-blooming-stages>

Canomanuel, G. 2011. Operación Polinizador, Syngenta. Congreso APOIDEA, Córdoba, España. Consultado en octubre del 2016 www3.syngenta.com/country/es/sp/agricultura_responsable/operacion-polinizador/Paginas/que-es-operacionpolinizador.aspx.

Cantagallo, J. E. 2000. Causas de la reducción del número potencial de frutos llenos en girasol (*Helianthus annuus* L.) por estrés lumínico. Tesis Magíster. Sc. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Pp 100.

Carrington, D. 2013. Loss of Wild Pollinators Serious Threat to Crop Yields, Study Finds | Environment. The Guardian. Consultado en junio del 2023. <https://www.theguardian.com/environment/2013/feb/28/wild-bees-pollinators-crop-yields>

Carvalho, L. G., Kunin, W. E., Keil, P., Aguirre-Gutiérrez, J., Ellis, W. N., Fox, R., Groupon, Q., Hennekens, S., Van Landuyt, W., Maes, D., Van de Meutter, F., Michez, D., Ransmont, P., Ode, B., Potts, S. G., Reemer, M., Roberts, S. P. M., Schaminee, J., Wallis de Vries, M. F., & Biesmeijer, J. C. 2013. Species richness declines and biotic homogenisation have slowed down for NW-European pollinators and plants. *Ecology Letters*, 16, 870–878.

Carvell, C., Westrich, P., Meek, W. R., Pywell, R. F., & Nowakowski, M. 2006. Assessing the value of annual and perennial forage mixtures for bumblebees by direct observation and pollen analysis. *Apidologie*, 37(3), 326-340.

Chambó, E. D., Oliveira, N. T. E., Garcia, R. C., Duarte-Júnior, J. B., Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., & Arnaut de Toledo, V. A. 2014. Pollination of rapeseed (*Brassica napus*) by Africanized honeybees (Hymenoptera: Apidae) on two sowing dates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*,(86), 2087-2100. DOI: 10.1590/0001-3765201420140134

Chamer, A. M., Devoto, M., Torreta, J. P., Medan, D., Mantese, A. I., Montaldo, N. H., Bartoloni, N. 2004. Polinización del girasol: efecto sobre el rendimiento. II Reunión Binacional de Ecología: 395. Del 1-5 de noviembre de 2004, Mendoza, Rep. Argentina.

- Chamer, A. M., Medan, D., Mantese, A. I., & Bartoloni, N. J. 2015. Impact of pollination on sunflower yield: Is pollen amount or pollen quality what matters? *Field Crops Research* 176, 61–70.
- Cheema, M. A., Malik, M. A., Hussain, A., Shah, S. H., & Basra, S. M. A. 2001. Effects of time and rate of nitrogen and phosphorus application on the growth and the seed and oil yields of canola (*Brassica napus* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 186(2), 103-110.
- Chown, S. L., & Gaston, K. J. 2010. Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biological Reviews*, 85(1), 139-169.
- Cook, S. M., Awmack, C. S., Murray, D. A., & Williams, I. H. 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition?. *Ecological Entomology*, 28(5), 622-627.
- Crane, E. 1990. *Bees and Beekeeping Science, Practice and World Resources*. Cornell University Press. Pp 640. ISBN 0434902713
- Crane, E., Walker, P., & Day, R. 1984. *Directory of important world honey sources*. International Bee Research Association. Pp 384. ISBN: 9780860981411
- Cresswell, J. E., Davies, T. W., Patrick, M. A., Russell, F., Pennel, C., Vicot, M., & Lahoubi, M. 2004. Aerodynamics of wind pollination in a zoophilous flower, *Brassica napus*. *Functional Ecology*, 861-866.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press. Pp 250
- Dafni, A., Kevan, P. G., & Husband, B.C. 2005. *Practical pollination biology*. Cambridge, Ontario: Enviroquest. Pp 590
- De Luca, P. A., Buchmann, S., Galen, C., Mason, A. C., & Vallejo-Marín, M. 2019. Does body size predict the buzz-pollination frequencies used by bees? *Ecology and Evolution*, 9(8), 4875-4887.
- de Oliveira, A. C., Junqueira, C. N., & Augusto, S. C. 2018. Pesticides affect pollinator abundance and productivity of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Apicultural Research*, 58(1), 2-8.

- DeGrandi-Hoffman, G. & Chambers, M. 2006. Effects of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Foraging on Seed Set in Self-Fertile Sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Environmental Entomol.*, 35(4), 1103-1108.
- Delaplane, K. S. & Mayer, D. F. 2000. *Crop Pollination by Bees*. CABI. Wallingford, U.K. Pp 344. ISBN: 085199783X, 9780851997834.
- Delaplane, K. S., Dag, A., Danka, R. G., Freitas, B. M., Garibaldi, L. A., Goodwin, R. M. & Hormaza, J. I. 2013. Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-28. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.12
- Delbrassine, S. & Rasmont, P. 1988. Contribution à l'étude de la pollinisation du colza, *Brassica napus* L. var. oleifera. Moench (Delile), en Belgique. *Bull. Rech. Agron. Gembloux, Belgique*, 23, 123–152.
- Di Pasquale, G., Alaux, C., Le Conte, Y., Odoux, J. F., Pioz, M., Vaissière, B.E., Belzunces, L.P. & 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., Robledo, C. W. 2018. *Infostat versión 2018*. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Diaz, B. M., Maza, N., Castresana, J. E., & Martínez, M. A. 2020. *Los sírfidos como agentes de control biológico y polinización en horticultura*. Ediciones INTA, Estación Experimental Agropecuaria Concordia, 2020. ISBN 978-987-8333-57-1
- Dickinson, H. G., Elleman, C. J., & Doughty, J. 2000. Pollen coatings—chimaeric genetics and new functions. *Sexual plant reproduction*, 12, 302-309.
- Diepenbrock, W. 2000. Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field crops research*, 67(1), 35-49.
- Droege, S. 2015. *The Very Handy Manual: How to Catch and Identify Bees and Manage a Collection*. Consultado en junio del 2023 <http://bio2.elmira.edu/fieldbio/beemanual.pdf>
- Ellis, E. C., Klein Goldewijk, K., Siebert, S., Lightman, D., & Ramankutty, N. 2010. Anthropogenic transformation of the biomes, 1700 to 2000. *Global Ecology and Biogeography*, 19, 589-606.

Ewert, R. 1929. Die Befruchtung der Cruciferenblüte durch die Biene. Arch. Bienenk., 10, 310-312.

Fahrenholz, L., Lamprecht, I., & Schrickler, B. 1992. Calorimetric investigations of different castes of honey bees, *Apis mellifera carnica*. J. Comp. Physiol. B, 162, 119–130.

FAO, 2016. Protocol to Detect and Monitor Pollinator Communities. Guidance for Practitioners. ISBN 978-92-5-108978-1. Pp 54.

FAOSTAT. 2022. Consultado en noviembre del 2022
<https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>

Fewell, J. H. & Winston, M.L. 1992. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. Behav. Ecol. Sociobiol., 30, 387-393.

Fischer, G., Casierra-Posada, F., & Piedrahíta, W. 2009. Ecofisiología de las especies pasifloráceas cultivadas en Colombia. En: Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Miranda, D., G. Fischer, C. Carranza, S. Magnitskiy, F. Casierra-Posada, W. Piedrahíta y L.E. Flórez (eds.). Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá. 45-68.

Free, J. B. 1993. Insect pollination of crops (2nd ed.). London, UK: Academic Press.

Freitas B. M. 1997. Number and distribution of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains on the bodies of its pollinators, *Apis mellifera* and *Centris tarsata*. Journal of Apicultural Research, 36(1), 15-22. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1997.11100926>

Fuentes, A. 2015. Identificación de especímenes y delimitación de morfoespecies. Versión 1. Pp 181-191 en: P.M. Jørgensen, A.F. Fuentes, T. Miranda y L. Cayola (eds.). Manual de Trabajo, Proyecto Inventario Botánico de la Región del Madidi. http://www.mobot.org/PDFs/research/madidi/Proyecto_Madidi_Manual_Ver1.pdf

Gallai, N. 2008. Array for the Economic Valuation of the Contribution of Insect Pollination to Agriculture and Impact on the Welfare. FAOSTAT VALUEARRAY.xls. <http://www.internationalpollinatorsinitiative.org/uploads/POLLINATION>.

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

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., & Winfree, R. 2014. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. *Front. Ecol. Environ.*, 12(8), 439–447. DOI:10.1890/130330

Garibaldi, L. A., Bommarco, R., Cunningham, S. A., Kremen, C., Vaissière, B. E., Gemmill-Herren, B., Hipólito, J., Freitas, B. M., Ngo, H. T., Azzu, N., Sáez, A., Åström, J., An, J., Blochtein, B., Buchori, D., García Chamorro, F. J., Oliveira da Silva, F., Devkota, K., de Fátima Ribeiro, M., Freitas, L., Gaglianone, M. C., Goss, M., Irshad, M., Kasina, M., Pacheco Filho, A. J. S., Piedade Kiill, L. H., Kwapong, P., Parra, G. N., Pires, C., Pires, V., Rawal, R. S., Rizali, A., Saraiva, A. M., Veldtman, R., Viana, B. F., Witter, S., & Zhang, H. 2016. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Sci. mag.* 351, 388–391.

Garibaldi, L. A., Morales, C. L., Ashworth, L., Chacoff, N. P., & Aizen, M. A. 2012. Los polinizadores en la agricultura. *Ciencia Hoy*, 21(126),35-43.

Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Kremen, C., Morales, J. M., Bommarco, R., Cunningham, S. A., Carvalheiro, L. G., Chacoff, N. P., Dudenhöffer, 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., Szentgyörgyi, H., Viana, B. F., Westphal, C., Winfree, R., & Klein, A. M. 2011. Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. *Ecology Letters*, 14(10), 1062-1072. doi: 10.1111/j.1461-0248.2011.01669.x

Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M. A., Bommarco, R., Cunningham, S. A., Kremen, C., Carvalheiro, L. G., Harder, L. D., Afik, O., Bartomeus, I., Benjamin, F., Boreux, V., Cariveau, D., Chacoff, N. P., Dudenhöffer, J. H., Freitas, B. M., Ghazoul, J., Greenleaf, S., Hipólito, J., Holzschuh, A., Howlett, B., Isaacs, R., Javorek, S., Kennedy, K., C. M., Krewenka, K. M., Krishnan, S., Mandelik, Y., Mayfield, M. M., Motzke, I., Munyuli, T., Nault, B. A., Otieno, M., Petersen, J., Pisanty, G., Potts, S. G., Rader, R., Ricketts, T. H., Rundlöf, M., Seymour, C. L., Schüepp, C., Szentgyörgyi, H., Taki, H., Tschardtke, T., . Vergara, C. H., Viana, B. F., Wanger, T. C., Westphal, C., Williams, N., Klein, A. M. 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science*, 339(6127), 1608-1611.

- Garratt, M. P. D., Breeze, T. D., Jenner, N., Polce, C., Biesmeijer, J. C., & Potts, S. G. 2014. Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 184, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.10.032>.
- Garratt, M. P. D., Potts, S. G., Banks, G., Hawes, C., Breeze, T. D., O'Connor, R. S., & Carvell, C. 2019. Capacity and willingness of farmers and citizen scientists to monitor crop pollinators and pollination services. *Global Ecology and Conservation*, 20, e00781.
- Geroff, R. K., Gibbs, J., & McCravy, K. W. 2014. Assessing bee (Hymenoptera: Apoidea) diversity of an Illinois restored tallgrass prairie: methodology and conservation considerations. *Journal of Insect Conservation*, 18(5), 951-964.
- Gollan, J. R., Ashcroft, M. B. & Batley, M. 2011. Comparison of yellow and white pan traps in surveys of bee fauna in New South Wales, Australia (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). *Australian Journal of Entomology*, 50(2), 174-178.
- Golubov, J., & Mandujano, M. 2009. ¿Por qué los polinizadores visitan a las flores? *Revista bimestral Casa del Tiempo*, 21, 39-41.
- Gómez-Campo, C. & Prakash, S. 1999. 2 Origin and Domestication. En: Gómez-Campo, C. (Ed), *Biology of Brassica Coenospecies*. Pp 33-58. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.
- Gómez-Martínez, C., González-Estévez, M. A., Cursach, J., & Lázaro, A. 2022. Pollinator richness, pollination networks, and diet adjustment along local and landscape gradients of resource diversity. *Ecological Applications*, e2634. DOI: 10.1002/eap.2634
- Gonçalves, R. B., & Oliveira, P. S. 2013. Preliminary results of bowl trapping bees (Hymenoptera, Apoidea) in a southern Brazil forest fragment. *J. Insect Biodiver.* 1: 1–9.
- Gonzalez, V. H., Osborn, A. L., Brown, E. R., Pavlick, C. R., Enríquez, E., Tscheulin, T., Petanidou, T., Hranitz, J. M., & Barthell, J. F. 2020. Effect of pan trap size on the diversity of sampled bees and abundance of bycatch. *Journal of insect conservation*, 24, 409-420.
- Goodrich, B. K. 2019. Do more bees imply higher fees? Honey bee colony strength as a determinant of almond pollination fees. *Food Policy* 83, 150–160.

- Goulson, D., Peat, J., Stout, J. C., Tucker, J., Darvill, B., Derwent, L. C., & Hughes, W. O. H. 2002. Can alloethism in workers of the bumblebee, *Bombus terrestris*, be explained in terms of foraging efficiency? *Animal Behaviour*, 64(1), 123–130. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.3041>
- Grandinetti, G. 2022. Incidencia de las recompensas florales en la producción de semilla híbrida de girasol. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 147.
- Greenleaf, S. S., & Kremen, C. 2006. Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13890-13895.
- Greenleaf, S. S., Williams, N. N., Winfree, R., & Kremen, C. 2007. Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*, 153, 589–596. DOI 10.1007/s00442-007-0752-9
- Grundel, R., Frohnapple, K. J., Jean, R. P., & Pavlovic, N. B. 2011. Effectiveness of bowl trapping and netting for inventory of a bee community. *Environmental Entomology*, 40(2), 374-380.
- Guzman Jacob, V. 2013. Diversidad de macroartrópodos asociados a tres especies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) en Tlalnelhuayocan, Veracruz. Tesis de grado. Centro de Investigaciones Tropicales, Universidad Veracruzana, Tlalnelhuayocan, Veracruz, México. Pp 81.
- Hagen, M. & Dupont, Y. L. 2013. La extensión intertegular y el ancho de la cabeza como estimadores de la masa corporal fresca y seca en abejorros (*Bombus* spp.). *Insectes Sociaux*, 60, 251-257.
- Hendrickx, F., Maelfait, J. P., Van Wingerden, W., Schweiger, O., Speelmans, M., Aviron, S., Augenstein, R. B., Bailey, D., Bukacek, R., Burel, F., Diekötter, T., Dirksen, F. H., Lira, J., Roubalova, M., Vandomme, V., & Bugter, R. 2007. How landscape structure, land-use intensity, and habitat diversity affect components of total arthropod diversity in agricultural landscapes. *Journal of Applied Ecology*, 44(2), 340-351.
- Heneberg, P., & Bogusch, P. 2014. To enrich or not to enrich? Are there any benefits of using multiple colors of pan traps when sampling aculeate Hymenoptera? *Journal of Insect Conservation*, 18(6), 1123-1136.

- Herrmann, F., Westphal, C., Moritz, R. F., & Steffan-Dewenter, I. N. 2007. Genetic diversity and mass resources promote colony size and forager densities of a social bee (*Bombus pascuorum*) in agricultural landscapes. *Molecular Ecology*, 16(6), 1167-1178.
- Howlett, B. G., Lankin-Vega, G. O., & Jesson, L. K. 2018. *Bombus terrestris*: A more efficient but less effective pollinator than *Apis mellifera* across surveyed white clover seed fields. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 47, 32–47. <https://doi.org/10.1080/01140671.2018.1466341>
- Howlett, B. G., Walker, M. K., Rader, R., Butler, R. C., Newstrom-Lloyd, L. E., & Teulon, D. A. J. 2011. Can insect body pollen counts be used to estimate pollen deposition on pak choi stigmas? *New Zealand Plant Protection*, 64, 25-31.
- Human, H. 2006. Evaluation of the floral rewards of *Aloe greatheadii* var *davyana* (Asphodelaceae), the most important indigenous South African bee plant (Doctoral dissertation, University of Pretoria). Pp 163.
- Hüsken, A., & Dietz-Pfeilstetter, A. 2007. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Research*, 16, 557-569.
- Hutchinson, L. A., Oliver, T. H., Breeze, T. D., O'Connor, R. S., Potts, S. G., Roberts, S. P., & Garratt, M. P. 2022. Inventorying and monitoring crop pollinating bees: Evaluating the effectiveness of common sampling methods. *Insect Conservation and Diversity*, 15(3), 299-311.
- INTA Barrow. 1996. El cultivo de colza-canola. Chacra Experimental Integrada Barrow Materiales de Divulgación N° 2 ISSN N° 0328 - 1353.
- Iriarte, L. & Valetti, O. 2008. Cultivo de colza. Chacra Experimental Integrada Barrow Convenio MAAyP – INTA. http://www.acopiadores.com/sites/default/files/gacetillas/14Liliana%20Iriarte%20-%20Cultivos%20de%20Colza_590398.pdf
- Iriarte, L. B. 2017. Macacha INTA: nuevo cultivar de colza. https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/3154/Agro_barrow_59_p.18.pdf?sequence=1

- Iriarte, L. B., & López, Z. B. 2014. El cultivo de colza en Argentina. Situación actual y perspectivas. Actas del 1° Simpósio Latino Americano de Canola. Passo Fundo, RS, Brasil. Pp 7. Disponible en: <http://www.cnpt.embrapa.br/slac/cd/pdf/Iriarte>, 20
- Ivey, C. T., Martinez, P., & Wyatt, R. 2003. Variation in pollinator effectiveness in swamp milkweed, *Asclepias incarnata* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 90(2), 214–225. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.2.214>
- Jones, J. C., Myerscough, M. R., Graham, S. & Oldroyd, B. P. 2004. Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability. *Science*, 305(5682), 402-404.
- Joshi, N. K., Leslie, T., Rajotte, E. G., Kammerer, M. A., Otieno, M., & Biddinger, D. J. 2015. Comparative trapping efficiency to characterize bee abundance, diversity, and community composition in apple orchards. *Annals of the Entomological Society of America*, 108(5), 785–799.
- Junker, R. R., Bleil, R., Daehler, C. C., & Blüthgen, N. 2010. Intra-floral resource partitioning between endemic and invasive flower visitors: Consequences for pollinator effectiveness. *Ecological Entomology*, 35(6), 760–767. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01237.x>
- Kakani, V. G., Reddy, K. R., Koti, S., Wallace, T. P., Prasad, P. V. V., Reddy, V. R., & Zhao, D. 2005. Differences in in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. *Annals of botany*, 96(1), 59-67.
- Kearns, C. A. & Inouye, D. W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado. Pp 583. ISBN: 9780870812798
- Kearns, C. A., & Inouye, D. W. 1997. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. *Bioscience*, 47(5), 297-307.
- Kevan, P. G., & Baker, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, 28(1), 407-453.
- Kevan, P. G. 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agricultural Ecosystems and Environment*, 74, 373–393.
- Kevan, P. G. 2008. Pollination and Flower Visitation. In: Capinera, J.L. (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_3027

Khatun, S., & Flowers, T. J. 1995. The estimation of pollen viability in rice. *Journal of Experimental Botany*, 46(1), 151–154. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.1.151>

King, C., Ballantyne, G., & Willmer, P. G. 2013. Why flower visitation is a poor proxy for pollination: Measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 811–818. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12074>

Kleijn, D., Winfree, R., Bartomeus, I., Carvalheiro, L. G., Henry, M., Isaacs, R., Klein, M. A., Kremen, C., M’Gonigle, L. K., Rader, R., Ricketts, T. H., Williams, N. M., Adamson, N. L., Ascher, J. S., Báldi, A., Batáry, P., Benjamin, F., Biesmeijer, J. C., Blitzer, E. J., Bommarco, R., Brand, M. R., Bretagnolle, V., Button, L., Cariveau, D. P., Chifflet, J. F., Danforth, B. N., Elle, E., Garratt, M. P. D., Herzog, F., Holzschuh, A., Howlett, B. G., Jauker, F., Jha, S., Knop, E., Krewenka, K. M., Le Féon, V., Mandelik, Y., May, E. A., Park, M. G., Pisanty, G., Reemer, M., Riedinger, V., Rollin, O., Rundlöf, M., Sardiñas, H. S., Scheper, J., Sciligo, A. R., Smith, H. G., Steffan-Dewenter, I., Thorp, R., Tschardtke, T., Verhulst, J., Viana, B. F., Vaissière, B. E., Veldtman, R., Ward, K. L., Westphal, C. & Potts, S. G. 2015. Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nature Communications*, 6(1), 1-9

Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tschardtke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-313.

Kleinschmidt, G. J. & Kondos, A. C. 1978. Effect of dietary protein on colony performance. *Australasian Beekeeper*, 80, 251-257.

Koeniger, N. 1978. Das Wärmes der Brut bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 9(4), 305-320.

Koutensky, J. 1959. Opylovaci ucinek vcely medonosne (*Apis mellifera* L.) nazvyseni hektarovych vynosu u rephyolejne a horcice bile sbornik. *Ces Kolovenske Akademie Zemedelskych Ved*. 5, 571-582.

Krahner, A., Schmidt, J., Maixner, M., Porten, M., & Schmitt, T. 2021. Evaluation of four different methods for assessing bee diversity as ecological indicators of agro-ecosystems. *Ecological Indicators*, 125, 107573.

Krell, R., Van Doorn, A., Inouye, D. W., Roubik, D. W., Heard, T. A., Kwapong, P., Cervancia, C. R., Fajardo Jr., A. C., Hassan Jalil, A., da Silva, C. I., Freitas, B. M., Sammataro, D., de Guzman, L., Kevan, P. G., Macfarlane, R. C., Davis, A. R., Davis, A. R., Buchmann, S. L., & Moreno, J. E. 2018. *The Pollination of Cultivated Plants: A Compendium for Practitioners 2*. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO). Rome, Italy. Pp 266. ISBN 978-92-5-130506-5

Kremen, C., Williams, N. M. & Thorp, R. W. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16812-16816.

Langridge, D. F. & Goodman, R. D. 1982. Honeybee pollination of oilseed rape, cultivar Midas. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 22(115), 124-126.

Le Féon, V., Burel, F., Chifflet, R., Henry, M., Ricroch, A., Vaissière, B. E. & Baudry, J. 2011. Solitary bee abundance and species richness in dynamic agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 166, 94-101. DOI:10.1016/j.agee.2011.06.020

Le Féon, V., Poggio, S. L., Torretta, J. P., Bertrand, C., Molina, G. A., Burel, F., Baudry, J., & Ghersa, C. M. 2015. Diversity and life-history traits of wild bees (Insecta: Hymenoptera) in intensive agricultural landscapes in the Rolling Pampa, Argentina. *Journal of Natural History*, 50(19-20), 1175-1196.

LeBuhn, G., Droege, S., Connor, E.F., Gemmill-Herren, B., Potts, S.G., Minckley, R. L., Griswold, T., Jean, R., Kula, E., Roubik, D. W., Cane, J., Wright, K. W., Frankie, G. & Parker, F. 2012. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. *Conservation Biology*, 27 (1), 113–120. DOI:10.1111/j.1523-1739.2012.01962.x

Li, C., Yu, M., Chen, F., & Wang, S. 2010. In vitro maturation and germination of *Jatropha curcas* microspores. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(4), 541–546.

Lindström, S. A. M., Herbertsson, L., Rundlöf, M., Smith, H. G., & Bommarco, R. 2015. Largescale pollination experiment demonstrates the importance of insect pollination in winter oilseed rape. *Oecologia* 180, 759–769. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3517-x>.

Lindström, S. A. M., Klatt, B. K., Smith, H. G., & Bommarco, R. 2018. Crop management affects pollinator attractiveness and visitation in oilseed rape. *Basic Appl. Ecol.* 26, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2017.09.005>.

- Lysak, M. A. y Koch, M. A. 2011. Phylogeny, genome, and karyotype evolution of crucifers (Brassicaceae). En: Schmidt, R. y Bancroft, I. (eds.) Genetics and Genomics of the Brassicaceae. Springer Berlin Heidelberg. New York, USA, Pp 1–31.
- 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.
- Maloof, J., & Inouye, D. 2000. Are nectar robbers cheaters or mutualists? Ecology, 81, 2651–2661. <https://doi.org/10.2307/177331>
- Mandelik, Y., Winfree, R., Neeson, T., & Kremen, C. 2012. Complementary habitat use by wild bees in agro-natural landscapes. Ecological Applications, 22(5), 1535-1546.
- Manning, R. & Wallis, I. R. 2005. Seed yields in canola (*Brassica napus* cv. Karoo) depend on the distance of plants from honeybee apiaries. Australian Journal of Experimental Agriculture, 45, 1307–1313.
- Marconi A., Gallez L. 2014. Cuantificación de granos de polen en el cuerpo de *Apis mellifera*. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura FILAPI 2014, Puerto Iguazú Argentina, 4 al 6 de septiembre de 2014. Libro de Actas, 157.
- Marini, L., Tamburini, G., Petrucco-Toffolo, E., Lindström, S. A. M., Zanetti, F., Mosca, G., & Bommarco, R. 2015. Crop management modifies the benefits of insect pollination in oilseed rape. Agric. Ecosyst. Environ. 207, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.03.027>.
- Marinozzi, L. A., Villamil, S. C., Gallez, L. M., Iriarte, L. B., & Carrasco, N. 2018. Diversidad de polinizadores de *Brassica napus* L. en el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Cap. 8: 99-106. En: Sistemas extensivos del sur de la región Pampeana. 1a ed. Coord.: Gallez L. M. y Pellegrini C. N. Editorial de la Universidad Nacional del Sur. EdiUNS. Pp 111. Bahía Blanca. ISBN: 978-987-655-206-6.
- Martínez-Laborde, J. B. 1999. Brassicaceae. En: Zuloaga, F. O. y Morrone, O. (eds.): Catálogo de las Plantas Vasculares de la Argentina. Dicotyledoneae. Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanical Garden 74:1-1246.
- Marzocca, A., Marisco, O., Del Puerto, O. 1976. Manual de malezas. 3º ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

- Mazzei, M. P., Vesprini, J. L., & Galetto, L. 2021. Seminatural habitats and their proximity to the crop enhances canola (*Brassica napus*) pollination and reproductive parameters in Argentina. *Crop Science*, 61(4), 2713-2721.
- McCrary, K. W. 2018. A review of sampling and monitoring methods for beneficial arthropods in agroecosystems. *Insects*, 9(4), 170.
- Mendoza Arroyo, G., Navarro Martínez, A., Ochoa Gaona, S. & Wal, H. 2011. Arquitectura arbórea y desarrollo del bosque de *Guaiacum sanctum* L. en Balam-kin, Campeche, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 17(2), 215-224.
- Mesquida, J., Renard, M., & Mesquida, B. 1987. Etude préliminaire sur la germination «in vitro» du pollen de colza (*Brassica napus* L. var. oleifera Metzger) et sur l'évolution dans le temps de son aptitude à germer. *Agronomie*, 7(6), 409-416. <https://doi.org/10.1051/agro:19870606>
- Mesquida, J., & Renard, M. 1984. Étude des quantités de pollen déposées sur le stigmate dans différentes conditions de pollinisation; influence sur la production de graines chez le colza d'hiver mâle-fertile. Cinquième symposium international sur la pollinisation, Versailles, France. 27-30 Septembre 1983, INRA éditions, 1984. Les colloques de l'INRA, 21,351-6
- Meyerhoff, G. 1954. Investigation of the effect of bee visits on rape. *Arch. F. Geßugelzucht und Kleintierkunde*, 3, 259-306.
- Michener, C. D. 2007. *The Bees of the World*. 2nd Edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland. Pp 953.
- Michener, C. D., McGinley, R. J., & Danforth, B. N. 1994. *The Bee Genera of North and Central America (Hymenoptera: Apoidea)*. Smithsonian Institution Press, Washington and London. Pp 209; illustrated. ISBN: 1-56098-256-X.
- Miller-Struttman, N. E., Geib, J. C., Franklin, J. G., Kevan, P. G., Holdo, R. M., Ebert-May, D., Lynn, A. M., Kettenbach, J. A., Hedrick, E., & Galen, C. 2015. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science*, 349,1541-1544. DOI:10.1126/science.aab0868
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Argentina. 2023. Estimaciones Agrícolas. Consultado en julio del 2023 <https://datosestimaciones.magyp.gob.ar>

Ministerio de Economía, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2023. Arrancó la Campaña federal "Más miel todo el año". Consultado en julio del 2023 <https://www.argentina.gob.ar/noticias>

Miñarro, M. & Prida, E. 2013. Hedgerows surrounding organic apple orchards in north-west Spain: potential to conserve beneficial insects. *Agricultural and Forest Entomology*, 15(4), 382-390.

Mitchell, J. C. & Petolino, J. F. 1988. Heat stress effects on isolated reproductive organs of maize. *Journal of Plant Physiology* 133: 625–628.

Montaldo, N. H., Medan, D., Roitman, G. G., D'Ambrogio, A. C., & Mantese, A. I. 1996. Éxito reproductivo de la colza (*Brassica napus* var. oleífera) en Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 101 (1), 35-41.

Montero, G. A. 2008. Comunidades de artrópodos en vegetación de áreas no cultivadas del sudeste de Santa Fe. Tesis de Maestría en Manejo y Conservación de Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Pp 208.

Morales, C. L. 2007. Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecología Austral*, 17(1), 51-65.

Morandin, L. A., & Kremen, C. 2013. Bee preference for native versus exotic plants in restored agricultural hedgerows. *Restoration Ecology*, 21(1), 26-32.

Morandin, L. A., & Winston, M. L. 2005. Wild bee abundance and seed production in conventional, organic, and genetically modified canola. *Ecological Applications*, 15(3), 871-881.

Morandin, L. A. & Winston, M. L. 2006. Pollinators provide economic incentive to preserve natural land in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 116(3–4), 289–292. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.02.012>

Morandin, L. A., Winston, M. L., Abbott, V. A., & Franklin, M. T. 2007. Can pastureland increase wild bee abundance in agriculturally intense areas? *Basic and Applied Ecology*, 8(2), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2006.06.003>

- Moreira, E. F., Santos, R. L. D. S., Penna, U. L., Angel-Coca, C., de Oliveira, F. F. & Viana, B. F. 2016. Are pan traps colors complementary to sample community of potential pollinator insects? *Journal of Insect Conservation*, 20(4), 583-596.
- Morrison, M. J. 1993. Heat stress during reproduction in summer rape. *Canadian Journal of Botany*, 71(2), 303–308. <https://doi.org/10.1139/b93-031>
- Morrison, M. J., Gutknecht, A., Chan, J., & Miller, S. S. 2016. Characterising canola pollen germination across a temperature gradient. *Crop and Pasture Science*, 67(4), 317-322.
- Morse, R., & Hooper, T. 1992. *Enciclopedia ilustrada de Apicultura*. El Ateneo, Buenos Aires. Pp 386. ISBN 950-02-3061-5
- Müller, H. 1883. *The Fertilisation of Flowers*. Macmillan & Co. Oxford University. Pp 669.
- Mussury, R. M., Fernandes, W. D., & Scalon, S. D. P. Q. 2003. Atividade de alguns insetos em flores de *Brassica napus* L. em Dourados-MS e a interação com fatores climáticos. *Ciência e Agrotecnologia*, 27, 382-388.
- Ne'eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S. G., & Dafni, A. 2010. A framework for comparing pollinator performance: Effectiveness and efficiency. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 85, 435–451. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00108.x>
- Nicolson, S.W. & 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
- O’Brien, C. & Arathi, H. S. 2018: Bee genera, diversity and abundance in genetically modified canola fields. *GM Crops & Food*, 9(1), 31-38. DOI: 10.1080/21645698.2018.1445470
- Oberle, G. D., & Goertzen, K. L. 1952. A method for evaluating pollen production of fruit varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* (59) 263-265.
- Oliveira, R. C., Menezes, C., Egea, S. A. E. & Imperatriz, F. V. L. 2012. Trap-nest for stingless bees (Hymenoptera, Meliponini). *Apidologie*, 44, 29-37.
- Ollerton, J., Erenler, H., Edwards, M., & Crockett, R. 2014. Extinctions of aculeate pollinators in Britain and the role of large-scale agricultural changes. *Science*, 346, 1360–1362.

- Ollerton, J., Price, V., Armbruster, W. S., Memmott, J., Watts, S., Waser, N. M., Totland, Ø., Goulson, G., Alarcón, R., Stout, J., & Tarrant, S. 2012. Overplaying the role of honey bees as pollinators: a comment on Aebi and Neumann (2011). *Trends in Ecology & Evolution*, 27(3), 141-142.
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120, 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Ouvrard, P. & Jacquemart, A. L. 2018. Review of methods to investigate pollinator dependency in oilseed rape (*Brassica napus*). *Field Crops Research*, 231, 18-29.
- Ouvrard, P., Quinet, M., & Jacquemart, A. L. 2017. Breeding system and pollination biology of Belgian oilseed rape cultivars (*Brassica napus*). *Crop Sci.* 57, 1455–1463. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.09.0735>
- Pandolfo, C. E. 2016. Caracterización agroecológica de poblaciones ferales brasicáceas con resistencia a herbicidas. Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 210.
- Parker, A. J., Tran, J. L., Ison, J. L., Bai, J. D. K., Weis, A. E., & Thomson, J. D. 2015. Pollen packing affects the function of pollen on corbiculate bees but not non-corbiculate bees. *Arthropod-Plant Interactions*, 9(2), 197-203.
- Peat, J., Tucker, J., & Goulson, D. 2005. Does intraspecific size variation in bumblebees allow colonies to efficiently exploit different flowers? *Ecological Entomology*, 30, 176–181.
- Peet, M. M., Sato, S., & Gardener, R. 1998. Comparing heat stress effects on male-fertile and male-sterile tomatoes. *Plant, Cell and Environment* 21: 225–231.
- Perez-Balam, J., Quezada-Euan, J. J., Alfaro-Bates, R., Medina, S., McKendrick, L., Soro, A., & Paxton, R. J. 2012. The contribution of honey bees, flies and wasps to avocado (*Persea americana*) pollination in southern Mexico. *Journal of Pollination Ecology*, 8, 42-47.
- Perrot, T., Gaba, S., Roncoroni, M., Gautier, J. L., & Bretagnolle, V. 2018. Bees increase oilseed rape yield under real field conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 266, 39-48.
- Philippe, J.M. 1991. La pollinisation par les abeilles. Édisud, Aix-en Provence, Francia. Pp 182. ISBN 2-85744-520-2.

- Phillips, B. B., Williams, A., Osborne, J. L. & Shaw, R. F. 2018. Shared traits make flies and bees effective pollinators of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Basic and Applied Ecology*, 32, 66-76.
- Pierre, J. 2001. The role of honeybees (*Apis mellifera*) and other insect pollinators in gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). In VIII International Symposium on Pollination-Pollination: Integrator of Crops and Native Plant Systems 561. Pp 47-52. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.561.6
- Pierre, J. & Renard, M. 2010. Bilan de 30 ans de travaux de recherche effectués en France sur la pollinisation du colza. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 17(3), 121-126.
- Pierre, J., Vaissière, B., Vallée, P., & Renard, M. 2002. Airborne pollen released by honeybee foraging in oilseed rape and its incidence on pollination. In AIP-INRA OGM et Environnement. Editions Quae. Paris, France.
- Pierre, J., Vaissière, B., Vallée, P., & Renard, M. 2010. Efficiency of airborne pollen released by honeybee foraging on pollination in oilseed rape: a wind insect-assisted pollination. *Apidologie* 41, 109–115.
- Pinheiro-Costa, B. K., Mesquita-Neto, J. N., Rego, J. O., & Schlindwein, C. 2018. Trade off between quantity and size of pollen grains in the heterandrous flowers of *Senna pendula* (Fabaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 32(3), 446-453. DOI: 10.1590/0102-33062018abb0132
- Popic, T. J., Davila, Y. C., & Wardle, G. M. 2013. Evaluation of common methods for sampling invertebrate pollinator assemblages: net sampling out-perform pan traps. *PLoS ONE* 8: e66665
- Portman, Z. M., Bruninga-Socolar, B., & Cariveau, D. P. 2020. The state of bee monitoring in the United States: a call to refocus away from bowl traps and towards more effective methods. *Annals of the Entomological Society of America*, 113(5), 337-342.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353.
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J., & Vanbergen, A. J. 2016. Safeguarding

pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632), 220–229. <https://doi.org/10.1038/nature20588>

Potts, S. G., Kevan, P. G. & Boone, J. W. 2005. Conservation in pollination: collecting, surveying and monitoring. In: A. Dafni, P. G. Kevan & B. C. Husband (Eds.). *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Ltd. Canada. Pp 401-434.

Potts, S. G., Vulliamy, B., Dafni, A., Ne'eman, G., & Willmer, P. 2003. Linking bees and flowers: how do floral communities structure pollinator communities? *Ecology*, 84(10), 2628-2642.

Prendergast, K. S., Menz, M. H., Dixon, K. W., & Bateman, P. W. 2020. The relative performance of sampling methods for native bees: an empirical test and review of the literature. *Ecosphere*, 11(5), e03076.

Proctor, M., & Yeo, P. 1973. *The Pollination of Flowers*. Timber Press, Portland, Oregon, U.S.A. Pp 479.

Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L. A., Garratt, M. P. D., Howlett, B. G., Winfree, R., Cunningham, S. A., Mayfield, M. M., Arthur, A. D., Andersson, G. K. S., Bommarco, R., Brittain, C., Carvalheiro, L. G., Chacoff, N. P., Entling, M. H., Foully, B., Freitas, B. M., Gemmill-Herren, B., Ghazoul, J., Griffin, S. R., Gross, C. L., Herzog, F., Hipólito, J., Jaggar, S., Jauker, F., Klein, A. M., Kleijn, D., Krishnan, S., Lemos, C. Q., Lindström, S. A. M., Mandelik, Y., Monteiro, V. M., Nelson, W., Nilsson, L., Pattemore, D. E., de O. Pereira, N., Pisanty, G., Potts, S. G., Reemer, M., Rundlöf, M., Sheffield, C. S., Scheper, J., Schüepp, H. G., Smith, D. A., Stanley, J. C., Szentgyörgyi, H., Taki, H., Vergara, C. H., Viana, B. F., Woyciechowski, M. 2016. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 146–151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517092112>

Rader, R., Edwards, W., Westcott, D. A., Cunningham, S. A., & 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2012.10.011>

Rader, R., Howlett, B. G., Cunningham, S. A., Westcott, D. A., NewstromLloyd, L. E., Walker, M. K., Teulon, D. A. J., & Edwards, W. 2009. Alternative pollinator taxa are equally efficient

but not as effective as the honeybee in a mass flowering crop. *Journal of Applied Ecology*, 46(5), 1080–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01700.x>

Rathke, G. W., Behrens, T., & Diepenbrock, W. 2006. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 117(2-3), 80-108.

Read, S. M., Clarke, A. E., & Bacic, A. 1993. Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W 38 pollen tubes by poly(ethylene glycol) and Cu(II) salts. *Plant Cell Biology Research Centre, School of Botany, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia. Protoplasma*, 177, 1-14.

Reddy, K. R., Hodges, H.F., & Reddy, V. R. 1992. Temperature effects on cotton fruit retention. *Agronomy Journal* 84: 26–30.

Renauld, M., Hutchinson, A., Loeb, G., Poveda, K., & Connelly, H. 2016. Landscape simplification constrains adult size in a native ground-nesting bee. *PLoS ONE*, 11(3), e0150946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150946>

Ricketts, T. H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Bogdanski, A., Gemmill-Herren, B., Greenleaf, S. S., Klein, A. M., Mayfield, M. M., Morandin, L. A., Ochieng, A., & Viana, B. F. 2008. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology Letters*, 11 (5), 499-515.

Rodriguez-Saona, C. R., Byers, J. A., & Schiffhauer, D. 2012. Effect of trap color and height on captures of blunt-nosed and sharp-nosed leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) and non-target arthropods in cranberry bogs. *Crop Protection*, 40, 132-144.

Roig Alsina, A. & Aizen, M.A. 1996. *Bombus ruderatus* Fabricius, un nuevo *Bombus* para la Argentina (Hymenoptera: Apidae). *Physis*, 51(120-121), 49-50.

Roig Alsina, A. 2008. Apiformes. En: Claps, L. E., Debandi, G., & Roig-Juñent, S. (Dir.) *Biodiversidad de artrópodos argentinos. Volumen 2. Pp 373-390. Editorial Sociedad Entomológica Argentina, Mendoza.*

Roig-Juñent, S., Claps, L. E. & Morrone, J. J. 2014. *Biodiversidad de artrópodos argentinos: Vol. 4. INSUE-UNT Ediciones. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán. Pp 547. ISBN 978-950-554-904-7*

- Rosa, A., Blochtein, B., Ferreira, N., & Witter, S. 2010. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) as a potential *Brassica napus* pollinator (cv. Hyola 432) (Brassicaceae), in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1075–1081. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000500024>
- Rosado Gordón, M. Á., Atlántico, J. B., & Ornos, C. 2002. Polinizadores y biodiversidad. Asociación Española de Entomología, Jardín Botánico Atlántico y Centro Iberoamericano de la Biodiversidad Eds. Consultado en septiembre del 2022. http://apollo.entomologica.es/cont/materiales/informe_tecnico.pdf
- Roubik, D. W. 2001. Ups and downs in pollinator populations: When is there a decline? *Conservation Ecology* 5(1), 2. <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art2/>
- Roubik, D. W., Sihag, R. C., Kevan, P. G., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., Aizen, M. A., Packer, L., Harder, L. D., Krell, R., Biddinger, D. J., Rajotte, E. G., Joshi, N. K., Cane, P., Ouvrard, A. L., Jacquemart, J. H., Taki, H., Kasina, M., Kiill, L. H. P., Ribeiro, M. de F., Siqueira, K. M. M., Silva, E. M. S., Martins, D. J., Macfarlane, R. P., Cane, J. H., & Mbaya, J. K. S. 2018. *The Pollination of Cultivated Plants: A Compendium for Practitioners 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy. Pp 324. ISBN 978-92-5-130512-6.*
- Roulston, T. A. H., & Goodell, K. 2011. The role of resources and risks in regulating wild bee populations. *Annual Review of Entomology*, 56, 293-312.
- Roulston, T. A. H., Smith, S. A., & Brewster, A. L. 2007. A comparison of pan trap and intensive net sampling techniques for documenting a bee (Hymenoptera: Apiformes) fauna. *J. Kans. Entomol.*, 80, 179–181.
- Sabbahi, R., De Oliveira, D. & Marceau, J. 2005. Influence of honeybee (Hymenoptera: Apidae) density on the production of canola (Crucifera: Brassicaceae). *Journal of Economic Entomology*, 98(2), 367-372. <https://doi.org/10.1093/jee/98.2.367>
- Sabbahi, R., De Oliveira, D., Marceau, J. 2006. Does the honeybee (Hymenoptera: Apidae) reduce the blooming period of canola? *J. Agronomy & Crop Science*, 192, 233—237.
- Sáez, A., Aizen, M. A., Medici, S., Viel, M., Villalobos, E., & Negri, P. 2020. Bees increase crop yield in an alleged pollinator-independent almond variety. *Scientific reports*, 10(1), 3177.

- Sáez, A., Sabatino, M., & Aizen, M. 2014. La diversidad floral del borde afecta la riqueza y abundancia de visitantes florales nativos en cultivos de girasol. *Ecología Austral*, 24(1), 94-102.
- Sato, S., Peet, M. M., & 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. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1187>
- Scheper, J., Reemer, M., van Kats, R., Ozinga, W. A., van der Linden, G. T., Schaminée, J. Siepel, H., & Kleijn, D. 2014. Museum specimens reveal loss of pollen host plants as key factor driving wild bee decline in The Netherlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49), 17552-17557.
- Seeley, T. D. 1995. *The wisdom of the hive*. Harvard University Press, Cambridge, MA. Pp 295. ISBN 9780674953765.
- Senapathi, D., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Kleijn, D., Potts, S. G. & Carneiro, L. G. 2015. Pollinator conservation – the difference between managing for pollination services and preserving pollinator diversity. *Current Opinion in Insect Science*, 12, 93–101.
- Shivanna, K. R., Linskens, H. F., & Cresti, M. 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(1), 38–42. <https://doi.org/10.1007/BF00226109>
- Simon, J. L & Wildavsky, A. 1992. Species Loss Revisited. *Society*, 30(1): 41-46.
- Simón-Porcar, V. I., Santos-Gally, R., & Arroyo, J. 2014. Long-tongued insects promote disassortative pollen transfer in style-dimorphic *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Journal of Ecology*, 102(1), 116-125.
- Simpson, J. 1961. Nest climate regulation in honey bee colonies: Honey bees control their domestic environment by methods based on their habit of clustering together. *Science* 133(3461), 1327–1333.
- Sircom, J., Arul Jothi, G. & Pinksen, J. 2018. Monitoring bee populations: are eusocial bees attracted to different colours of pan trap than other bees? *Journal of Insect Conservation*, 22(3–4), 433–441. <https://doi.org/10.1007/s10841-018-0071-y>

Socias i Company, R. 1998. Fruit tree genetics at a turning point: the almond example. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 588-601.

Solís-Montero, L., & Vallejo-Marin, M. 2017. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. *Ecology and Evolution*, 7, 2706–2715. <https://doi.org/10.1002/ece3.2897>

Southwick, E. E., & Heldmaier, G. 1987. Temperature control in honey bee colonies. *Bioscience*, 37(6), 395-399.

Stabentheiner, A., Kovac, H., & Brodschneider, R. 2010. Honeybee colony thermoregulation - Regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PLoS ONE*, 5(1): e8967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008967>

Stalidzans, E., & Berzonis, A. 2013. Temperature changes above the upper hive body reveal the annual development periods of honey bee colonies. *Computers and Electronics in Agriculture*, 90, 1-6.

Stanley, D. A., Gunning, D., & Stout, J. C. 2013. Pollinators and pollination of oilseed rape crops (*Brassica napus* L.) in Ireland: ecological and economic incentives for pollinator conservation. *J. Insect Conserv.* 17, 1181–1189. <https://doi.org/10.1007/s10841-013-9599-z>.

Stavert, J. R., Liñán-Cembrano, G., Beggs, J. R., Howlett, B. G., Pattermore, D. E., & Bartomeus, I. 2016. Hairiness: The missing link between pollinators and pollination. Pp 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.2779>

Steffan-Dewenter, I. 2003. Seed set of male-sterile and male-fertile oilseed rape (*Brassica napus*) in relation to pollinator density. *Apidologie* 34, 227–235. DOI: 10.1051/apido:2003015

Steffan-Dewenter, I., Münzenberg, U., Bürger, C., Thies, C., & Tschardtke, T. 2002. Scale-dependent effects of landscape context on three pollinator guilds. *Ecology*, 83(5), 1421-1432.

Taylor, L. P. & 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

Thompson, A., Frenzel, M., Schweiger, O., Musche, M., Groth, T., Roberts, S. P., Tiffany, M. K., & Knight, T. M. 2021. Pollinator sampling methods influence community patterns assessments by capturing species with different traits and at different abundances. *Ecological Indicators*, 132, 108284.

- Thorp, R. W. 1979. Structural, behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66(4), 788-812.
- Thorp, R. W. 2000. The collection of pollen by bees. En: *Pollen and Pollination*. Dafni, A., Hesse, M., & Pacini, E. (Eds.). Springer Science & Business Media. Pp 211-223.
- Thurling, N. 1974. Morphological determinants of yield in rapeseed (*Brassica campestris* and *Brassica napus*). II. Yield components. *Aust. J. Agric. Res.*, 25, 711–721.
- Timmons, A. M., O'Brien, E. T., Charters, Y. M., Dubbels, S. J., & Wilkinson, M. J. 1995. Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. En: *The Methodology of Plant Genetic Manipulation: Criteria for Decision Making*. Proceedings of the Eucarpia Plant Genetic Manipulation Section Meeting. Pp 417-423. Springer Netherlands.
- Tinbergen, N., & Perdeck, A. C. 1950. On the stimulus situation releasing the begging response in the newly hatched herring gull chick (*Larus argentatus argentatus* Pont.). *Behaviour*, 1-39.
- Toler, T. R., Evans, E. W. & Tepedino, V. J. 2005. Pan-trapping for bees (Hymenoptera: Apiformes) in Utah's West Desert: the importance of color diversity. *Pan Pacific Entomologist*, 81(3-4), 103-113.
- Torretta, J. P., López, M. C., & Marrero, H. J. 2021. Las moscas de las flores (Diptera: Syrphidae) en agroecosistemas pampeanos: un caso de estudio. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 80(2), 23-34.
- Torretta, J. P., Medan, D., & Abrahamovich, A. H. 2006. First record of the invasive bumblebee *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in Argentina. *Transactions of the American Entomological Society*, 132(3), 285-289.
- Tscharntke, T., Klein, A. M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., & Thies, C. 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity–ecosystem service management. *Ecology Letters*, 8(8), 857-874.
- Tuell, J. K., & Isaacs, R. 2009. Elevated pan traps to monitor bees in flowering crop canopies. *Entomol. Exp. Appl.*, 131, 93–98.

- Tuell, J. K., Ascher, J. S. & Isaacs, R. 2009. Wild bees (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) of the Michigan highbush blueberry agroecosystem. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(2), 275-287.
- USDA, 2022. United States Department of Agriculture. Consultado en junio del 2023 <https://www.fas.usda.gov/regions/argentina>
- Villemant, C. 2005. Les nids d'abeilles solitaires et sociales. *Insectes*, 137(2), 13-17.
- Warwick, S. I. 2011. "Brassicaceae in Agriculture," In: R. Schmidt and I. Bancroft, Eds., *Genetics and Genomics of the Brassicaceae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, Springer, New York, Pp 33-65. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0_2
- Westcott, L. & Nelson, D., 2001. Canola pollination: an update. *Bee World*, 82, 115–129. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099514>.
- Westphal, C., Bommarco, R., Carré, G., Lamborn, E., Morison, N., Petanidou, T., Potts, S., Roberts, S. P. M., Szentgyörgyi, H., Tscheulin, T., Vaissière, B., Woyciechowski, M., Biesmeijer, J. C., Kunin, W. E., Settele, J., & Steffan-Dewenter, I. 2008. Measuring bee diversity in different European habitats and biogeographical regions. *Ecological Monographs*, 78(4), 653-671.
- Westphal, C., Steffan-Dewenter, I., & Tschardtke, T. 2003. Mass flowering crops enhance pollinator densities at a landscape scale. *Ecology Letters*, 6(11), 961-965.
- Williams, I. H. 1980. Oil-Seed Rape and Beekeeping, Particularly in Britain, *Bee World*, 61:4, 141-153, DOI: 10.1080/0005772X.1980.11097797
- Williams, I. H. 1984. The concentrations of air-borne rape pollen over a crop of oil-seed rape (*Brassica napus* L.). *The Journal of Agricultural Science*. 103 (2), 353-357.
- Williams, I. H. 1985. The Pollination of Swede Rape (*Brassica napus* L.). *Bee World*, 66:1, 16-22, DOI: 10.1080/0005772X.1985.11098817
- Williams I. H. 2002. Insect Pollination and Crop Production: A European Perspective. IN: Kevan P & Imperatriz Fonseca VL (eds) - *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature* - Ministry of Environment / Brasília. Pp 59-65.

- Williams, I. H., Corbet, S. A., & Osborne, J. L. 1991. Beekeeping, Wild Bees and Pollination in the European Community. *Bee World*, 72(4), 170-180. DOI: 10.1080/0005772X.1991.11099101
- Williams, I. H., Martin A. P., & White R. P. 1987. The effect of insect pollination on plant development and seed production in winter oil-seed rape (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Sci.*, 109, 135-139.
- Williams, N. M., Minckley, R. L., & Silveira, F. A. 2001. Variation in native bee faunas and its implications for detecting community changes. *Conservation Ecology*, 5(1),7. <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art7>
- Williams, P. H. 1986. Environmental change and the distributions of British bumble bees (*Bombus* Latr.). *Bee world*, 67(2), 50-61.
- Willmer, P. G. 2011. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press. Pp 781.
- Wilson, E. O. 1992. *The Diversity of Life*. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press. Pp 424. ISBN 0-674-21298-3.
- Winfree, R. 2010. The conservation and restoration of wild bees. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195(1), 169-197.
- Witter, S., Blochtein, B., Nunes-Silva, P., Pereira Tirelli, F., Lisboa, B. B., Bremm, C., & Lanzer, R. 2014. The bee community and its relationship to canola productivity in homogenous agricultural areas. *Journal of Pollination Ecology*, 12(3), 15-21.
- Woittiez, L. S., Van Wijk, M. T., Slingerland, M., Van Noordwijk, M., & Giller, K. E. 2017. Yield gaps in oil palm: A quantitative review of contributing factors. *European Journal of Agronomy*, 83, 57-77.
- Wood, T. J., Holland, J. M., & Goulson, D. 2015. A comparison of techniques for surveying farmland bumblebee populations. *Oecologia*, 177, 1093–1102.
- Wood, T. J., Holland, J. M., & Goulson, D. 2017. Providing foraging resources for solitary bees on farmland: current schemes for pollinators benefit a limited suite of species. *Journal of Applied Ecology*, 54(1), 323-333.

Woodcock, B. A., Bullock, J. M., McCracken, M., Chapman, R. E., Ball, S. L., Edwards, M. E., Nowakowski, M., & Pywell, R. F. 2016. Spill-over of pest control and pollination services into arable crops. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 231, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.023>.

Xun, L., Huang, X., Li, Q., Yang, S., & Wang, Y. 2020. Effects of different bee pollens on expression of major royal jelly protein genes and yield, quality and composition of royal jelly of *Apis mellifera*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 32(2), 856-869.

Young, L. W., Wilen, R. W., & Bonham-Smith, P. C. 2004. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 485–495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh038>

Zhang, H., Huang, J., Williams, P. H., Vaissière, B. E., Zhou, Z., Gai, Q., Dong, J., & An, J. 2015. Managed bumblebees outperform honeybees in increasing peach fruit set in China: Different limiting processes with different pollinators. *PLoS ONE*, 10(3): e0121143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121143>

Zurbuchen, A., Landert, L., Klaiber, J., Müller, A., Hein, S., & Dorn, S. 2010. Maximum foraging ranges in solitary bees: Only few individuals have the capability to cover long foraging distances. *Biological Conservation*, 143(3), 669–676. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.12.003>