

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**UTILIZACIÓN DE ABEJORROS NATIVOS, *BOMBUS ATRATUS*  
Y *BOMBUS BELLICOSUS* PARA PRODUCCION DE SEMILLAS  
DE TRÉBOL ROJO.**

**por**

**Sheena Marie SALVARREY MENDOZA**

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
*Magister* en Ciencias Agrarias  
Opción Ciencia Animal.

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
Agosto 2012

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (Dra) Mónica Rebuffo, Lic. (Dra) Gabriela Speroni y Lic. (Dra) Patricia Gonzáles, el 3 de agosto de 2012.  
Autora: Lic. Sheena Salvarrey. Director: Ing. Agr. (Mag) Carlos Rossi, Co-director:  
Lic. (Dr) Ciro Invernizzi.

Dedico este trabajo a mi hijo, *Patricio*...

## AGRADECIMIENTOS

A Carlos Rossi, por aceptar ser mi orientador y por todo el asesoramiento brindado, sobre todo en la parte agronómica.

A Gabriela Speroni, Patricia González, Mónica Rebuffo y Laura Aristarraga por aceptar formar parte del tribunal, por los aportes realizados y por la colaboración que permitieron la finalización de mis estudios de maestría.

A Comisión Sectorial Investigación Científica (CSIC), por el apoyo a través del financiamiento del proyecto de trabajo de esta tesis y por el otorgamiento de una beca.

A Facultad de Agronomía, en especial a la Unidad de Posgrado y Educación Permanente, que me abrieron sus puertas permitiendo la realización de esta maestría.

A INIA, por poner a disposición sus instalaciones, particularmente al personal del laboratorio de semillas y de apicultura, por su gran aporte al trabajo.

Al Ing. Agr. Yamandú Mendoza por la colaboración y el apoyo de siempre.

A María Ruiz, Valeria Rodríguez, Alejandro Arbulo y Rodrigo Zarza, por su colaboración en el trabajo de campo.

Muy especialmente va mi agradecimiento a Ciro Invernizzi, Estela Santos y Natalia Arbulo, quienes son responsables de mi dedicación al estudio de los abejorros. Ciro, por ser un orientador tanto en lo profesional como en lo personal y Natalia, por ser una gran compañera de trabajo y amiga.

A mis hermanas: *Elena, Stephanie y Juli*, que siempre están. A mi sobrina: *Emma*.

A mis padres; *Juana y Luis*, responsables de lo que soy.

A mi compañero de todas las horas: *Diego*, muchas gracias!!

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1. <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
1.1 ASPECTOS GENERALES.....	1
1.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD POLINIZADORA DE <i>BOMBUS ATRATUS</i> FRANKLIN Y <i>BOMBUS BELLICOSUS</i> SMITH EN EL TRÉBOL ROJO ( <i>TRIFOLIUM</i> <i>PRATENSE</i> ).....	3
1.3 CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS; <i>B.</i> <i>ATRATUS</i> Y <i>B. BELLICOSUS</i> .....	8
1.4 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA A SER ABORDADO Y RELEVANCIA DEL MISMO PARA EL SECTOR PRODUCTIVO.....	14
1.5 OBJETIVOS.....	15
1.5.1. <b><u>Objetivo General</u></b> .....	15
1.5.2. <b><u>Objetivos Específicos</u></b> .....	15
2. <b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	17
2.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD POLINIZADORA.....	17
2.1.1. <b><u>Aspectos generales</u></b> .....	17
2.1.2. <b><u>Obtención de nidos de abejorros</u></b> .....	17
2.1.3. <b><u>Demarcación de las parcelas experimentales de</u></b> <b><u>trébol rojo</u></b> .....	19
2.1.4. <b><u>Instalación de carpas de aislación de insectos</u></b> .....	19

2.1.5.	<b><u>Actividad de los abejorros</u></b> .....	20
2.1.5.1.	En los nidos.....	20
2.1.5.2.	En las parcelas experimentales.....	22
2.1.5.3.	En todo el semillero.....	22
2.1.6.	<b><u>Colecta de polen en colmenas de abejas melíferas</u></b> .....	23
2.1.7.	<b><u>Velocidad de pecoreo de <i>B. atratus</i>, <i>B. bellicosus</i> y <i>A. mellifera</i></u></b> .....	23
2.1.8.	<b><u>Rendimiento de semillas</u></b> .....	23
2.1.9.	<b><u>Determinación del origen botánico de las muestras de polen y néctar</u></b> .....	25
2.1.10.	<b><u>Análisis estadísticos</u></b> .....	25
2.2	<b>CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS</b> .....	26
3.	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	28
3.1	<b>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD POLINIZADORA</b> .....	28
3.1.1.	<b><u>Tamaño y ritmo de las colonias de abejorros</u></b> .....	29
3.1.2.	<b><u>Evolución de las inflorescencias atractivas en la pradera</u></b> .....	30
3.1.3.	<b><u>Presencia de abejorros en la pradera</u></b> .....	30
3.1.4.	<b><u>Otros insectos presentes en la pradera</u></b> .....	34
3.1.5.	<b><u>Origen botánico del néctar y el polen colectados por los abejorros y las abejas melíferas</u></b> .....	36
3.1.6.	<b><u>Velocidad de pecoreo de <i>B. atratus</i>, <i>B. bellicosus</i> y <i>A. mellifera</i></u></b> .....	37
3.1.7.	<b><u>Rendimiento de semillas</u></b> .....	39
3.1.7.1.	En las parcelas experimentales.....	39
3.1.7.2.	En las carpas.....	42
3.2	<b>CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS</b> .....	43

4. <b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	46
4.1 <b>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD</b>	
<b>POLINIZADORA</b> .....	46
4.1.1. <b><u>Tamaño y ritmo de actividad de las colonias de abejorros</u></b> .....	46
4.1.2. <b><u>Presencia de los abejorros en el semillero</u></b> .....	48
4.1.3. <b><u>Otros insectos presentes en el semillero</u></b> .....	49
4.1.4. <b><u>Origen botánico del néctar y el polen colectados por los abejorros y las abejas melíferas</u></b> .....	50
4.1.5. <b><u>Velocidad de pecoreo de <i>B. atratus</i>, <i>B. bellicosus</i> y <i>A. mellifera</i></u></b> .....	51
4.1.6. <b><u>Rendimiento de semillas</u></b> .....	53
4.1.6.1. En las parcelas experimentales.....	53
4.1.6.2. En las carpas.....	56
4.2. <b>CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS</b> .....	58
5. <b><u>CONSIDERACIONES FINALES</u></b> .....	61
6. <b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	63
7. <b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	64
8. <b><u>ANEXOS</u></b> .....	73

## RESUMEN

En Uruguay la producción histórica de semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*) está por debajo de su potencial biológico. Una de las limitaciones puede deberse a la dificultad de polinización. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de semillas de trébol rojo bajo condiciones de campo utilizando los abejorros nativos, *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* como polinizadores principales. Se utilizó un semillero de trébol rojo (variedad: Estanzuela 116) de 5 hectáreas en segunda floración. En febrero, nueve colonias de *B. atratus* y tres de *B. bellicosus* (media  $\pm$  SD:  $99 \pm 36$  individuos) fueron ubicados en uno de los lados del semillero. Se establecieron 25 parcelas experimentales de 2 x 5 m a diferentes distancias desde la ubicación de los nidos. Las semillas de trébol rojo cosechadas de cada parcela, se relacionaron con varios indicadores de rendimiento. Se encontró que el número de abejorros está asociado con: el número de inflorescencias maduras/m<sup>2</sup>, el número de inflorescencias/m<sup>2</sup> y la producción de semillas (g/m<sup>2</sup>). La proporción media de semillas por flor en una inflorescencia fue de 64,4 %. Adicionalmente, en esta tesis, se presentan los resultados de dos experiencias de cría en cautiverio de los abejorros *B. atratus* y *B. bellicosus* a partir de reinas fecundadas capturadas en el campo durante la primavera. El número de colonias obtenidas en relación al número inicial de reinas fue de 21,5 y 30,3 % para la primera y segunda temporada, respectivamente. Los buenos resultados de producción de semillas de trébol rojo empleando abejorros como polinizadores, sumado a la posibilidad de obtener colonias a través de la cría en cautiverio, abren la posibilidad para incrementar la producción de semillas de esta leguminosa forrajera aplicando una propuesta biotecnológica innovadora, mostrando la factibilidad de su implementación en Uruguay.

**Palabras clave:** *Trifolium pratense*, polinización, abejorros nativos, cría en cautiverio

## **USE OF NATIVE BUMBLEBEES *BOMBUS ATRATUS* AND *BOMBUS BELLICOSUS* FOR SEED PRODUCTION OF RED CLOVER**

### **SUMMARY**

In Uruguay, red clover has historically had seed yields well below the biological potential of the species. One of the limitations identified to increase yields is poor crop pollination. The objective of the present research was to evaluate seed production of red clover under field conditions using native bumble bees *Bombus atratus* and *B. bellicosus* as main pollinators. In February, nine colonies of *B. atratus* and three of *B. bellicosus* were placed at one end of a 5 hectares red clover (cultivar: Estanzuela 116) field which was in its second bloom. 25 plots (2 x 5 m) were demarcated in the field at different distances from the nests. The plots were threshed and several indicators of seed yield were calculated. The results obtained show bumblebees were not distributed along the field following a gradient from the location of the nests. Instead, their density was positively associated with the number of attractive inflorescences present in the culture. This indicates that bumblebees were distributed according to resource availability. Seed yield indicators were very good. The best indicator of yield, because it depends on the pollination of the crop, was the proportion of seeds per inflorescence that reached 68.9 % in the plots and 77.3 % in the tent containing a colony of bumblebees. In this thesis, the results of two experiences of captive breeding of *B. atratus* and *B. bellicosus* from fertilized queens captured in the field during the spring are also presented. The number of colonies obtained relative to the initial number of queens was 21.5 and 30.3 % for the first and second seasons, respectively. The success of red clover seed production using bumblebees as pollinators, coupled with the possibility of getting colonies through captive breeding of these insects opens a possibility to increase seed production of this forage legume by applying an innovative biotech proposal.

**Key words:** *Trifolium pratense*, pollination, native bumblebees, rearing.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ASPECTOS GENERALES

Los abejorros pertenecientes al género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) son abejas primitivamente eusociales que presentan un ciclo anual. Las jóvenes reinas fecundadas emergen de la hibernación al comienzo de la temporada cálida y cada una funda una nueva colonia anidando generalmente en cavidades o depresiones en o cerca de la superficie del suelo. Al principio la reina realiza las tareas de construcción, aprovisionamiento del nido y cuidado de la cría. En condiciones normales la primera camada, así como varias subsiguientes, está formada exclusivamente por obreras las cuales se encargaran de realizar todas las actividades que hasta el momento realizaba la reina (mantenimiento, aprovisionamiento del nido y cuidado de la cría) y ésta, se dedica exclusivamente a poner huevos, aunque también participa en el cuidado de la cría. Las colonias continúan su crecimiento y desarrollo hasta que, por lo general a principios de otoño, ocurre un cambio en la producción de obreras hacia la producción de reproductores (machos y reinas). Los machos abandonan el nido pocos días después de emerger, buscan pareja, se aparean y mueren. Las jóvenes reinas luego del apareamiento acumulan reservas y buscan un lugar resguardado y seco bajo tierra para hibernar. En algunos casos, antes de comenzar la hibernación, pueden permanecer por un tiempo en el nido cumpliendo con las tareas comunes a las obreras, incluyendo la actividad de forrajeo. En otoño la reina vieja muere, y paulatinamente también lo hacen las obreras finalizando así el ciclo de la colonia (Heinrich 2004, Goulson 2003a, 2003b, Free 1993, Michener 1974).

El género está ampliamente distribuido en las regiones Holártica, Oriental y Neotropical del mundo (Cameron y Williams 2003). Para Uruguay están citadas cuatro especies pertenecientes al subgénero *Fervidobombus*: *Bombus atratus* Franklin, *B. bellicosus* Smith, *B. brasiliensis* Lepeletier y *B. morio* Swederus. Las dos primeras son comúnmente encontradas en distintas regiones del país, mientras que las otras dos están registradas para una única localidad (Williams *et al.* 2008, Abrahamovich *et al.* 2004, Abrahamovich y Díaz 2002) y en trabajos más

recientes no se ha constatado su presencia. *Bombus atratus* presenta polimorfismo cromático observándose una forma melánica, totalmente negra y una forma flavínica, pudiendo presentar dos bandas amarillas en el tórax y una en el abdomen. *B. bellicosus*, es de color negro y presenta la superficie dorsal del tórax provisto de gruesos pelos amarillos (Abrahamovich *et al.* 2004).

Los abejorros han sido ampliamente reconocidos como excelentes polinizadores debido a que presentan numerosas características morfológicas y comportamentales que las hacen eficientes en diversos cultivos. Entre esas características se destacan las siguientes: Cuerpos de tamaño grande con pelos gruesos y numerosos que les permite remover gran cantidad de polen (Goulson 2003a, Brodie 1996). Probóscides largas, que le permiten forrajear en especies vegetales con flores de corolas profundas (Heinrich 2004, Goulson 2003a, Brodie 1996). Pueden trabajar a muy bajas temperaturas, lo que los hace esenciales polinizadores en zonas con clima templados y fríos donde se hace imposible la utilización de abejas melíferas (Goulson 2003a). Esta característica les permite también aumentar el horario diario de pecoreo (Estay *et al.* 2001). Son capaces de realizar polinización por zumbido. Algunas plantas presentan anteras que liberan el polen en zonas muy limitadas (dehiscencia poricida), por lo que requieren un manejo especial para la obtención del mismo. Los abejorros al visitar las flores, posan el tórax sobre las anteras y contraen los músculos de vuelo produciendo una vibración o zumbido que permite la liberación del polen (Goulson 2003a). Este comportamiento especializado no lo poseen todas las abejas, razón por la cual los abejorros son polinizadores muy importantes para las plantas que poseen anteras con esta morfología particular. Entre éstas se encuentran las Solanáceas, que incluyen especies cultivadas como el tomate (*Lycopersicum esculentum*) y la papa (*Solanum tuberosum*) (Heinrich 2004, Goulson 2003a, Kearns y Thomson 2001).

A pesar de su gran eficiencia los abejorros generalmente no son lo suficientemente abundantes como para polinizar adecuadamente todas las flores en un cultivo grande (Carámbula 1981, Holm 1966, Peterson *et al.* 1960, Bohart 1957). La principal razón para esto es que las poblaciones naturales de abejorros fluctúan anual y regionalmente de forma impredecible. Esta variación es resultado de la combinación de muchos factores entre los que se destacan las condiciones

climáticas, la disponibilidad de alimento y de sitios de anidación y los depredadores y parásitos (Heinrich 2004, Goulson 2003a, 2003b, Michener 1974, Holm 1966). Otro factor importante que afecta el número de abejorros en un cultivo y que debe ser tenido en cuenta, es el momento de mayor floración del cultivo, que puede no coincidir con el pico de la población de abejorros (Holm 1966). La abundancia de abejorros en un cultivo puede ser incrementada de varias maneras (Goulson 2003b, Shepherd *et al.* 2003, Kearns y Thomson 2001, Holm 1966): conservando y fomentando sitios de anidación apropiados en las cercanías del cultivo, por ejemplo manteniendo vegetación ruderales (como pueden ser la solanáceas o asteráceas) en los bordes del mismo; trasladando nidos desde otras zonas hacia la plantación; y manejando el cultivo de manera tal que el pico de floración coincida con el momento de mayor abundancia de abejorros en la región.

Dada la importancia de los abejorros como polinizadores, el conocimiento sobre los aspectos biológicos, ecológicos y comportamentales ha crecido ampliamente, permitiendo la cría en cautiverio de algunas especies europeas (*B. terrestris*,) y norteamericanas (*B. impatiens*) (Velthuis y van Door 2006, Velthuis 2002). Gracias a los avances en el manejo de estos insectos, actualmente se comercializan sus colonias, lo que ha resultado en la introducción de algunas especies en países, que carecen de abejorros nativos, como por ejemplo Nueva Zelanda (Goulson 2003, Velthuis 2002, Brodie 1996). Adicionalmente, países que cuentan con especies nativas, también han importado especies exóticas para maximizar la producción agrícola (Velthuis y van Door 2006).

## **1.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD POLINIZADORA DE *BOMBUS ATRATUS* FRANKLIN Y *BOMBUS BELLICOSUS* SMITH EN EL TRÉBOL ROJO (*TRIFOLIUM PRATENSE*)**

El trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) es una de las leguminosas forrajeras más utilizadas en el mundo. Es importante no sólo como forrajera en pastoreo directo, henificación y ensilaje, sino también como mejoradora del suelo, abono verde y como melífera. Originaria de Europa, se ha naturalizado en América en

regiones templado-frías y con elevados índices de humedad (Izaguirre y Beyhaut 1997). Cultivado solo o en mezclas, se adapta a un amplio rango de condiciones climáticas, tipos de suelo y niveles de acidez (Palacio 1987). En Uruguay es común su alta producción en praderas de suelos húmedos, aunque prospera igualmente en suelos de baja fertilidad, pesados o de horizonte superficial. Se cultiva extensamente, siendo una de las especies de leguminosas preferidas para las praderas mixtas artificiales, sobre todo en la zona sur y litoral del país (Izaguirre y Beyhaut 1997).

En Uruguay, según datos de Instituto Nacional de Semillas (INASE) en los últimos 5 años (2007 a 2011) se han utilizado entre 780 y 1320 toneladas de semilla de trébol rojo. Esto podría determinar un área de siembra de 130 a 230.000 has. La importancia de la semilla importada ha ido creciendo y en las últimas dos zafas ha significado más del 60 % de la semilla comercializada en el país. Esto se debe en parte a que la producción de semillas se encara generalmente como un rubro accesorio en la producción agropecuaria, ya que solo una pequeña fracción de los productores uruguayos la utilizan como rubro principal (García *et al.* 1991). El promedio nacional de producción de semilla de trébol rojo es de 119 kg/ha con un rango de 45 a 255 kg/ha, valores muy por debajo del potencial de la especie (García *et al.* 1991).

Esto plantea la necesidad de generar tecnologías adecuadas para una producción nacional más eficiente de semillas de trébol rojo de manera de disminuir la dependencia de semillas importadas. Dentro de esas tecnologías le cabe un rol protagónico a la polinización entomófila ya que frecuentemente es el factor responsable de limitar la producción de semillas de este cultivo (García *et al.* 1991, Palacio 1987, Holm 1966).

El trébol rojo es auto-estéril, o sea que el polen no puede fertilizar los óvulos de la misma planta, por lo que requiere de polinización cruzada (Carámbula 1981). La inflorescencia está formada por 76 a 111 flores, cuya corola es un tubo largo y angosto de 7,5 a 12,4 mm de largo y 1,6 a 2,5 mm de ancho (Formoso 2010, Varela y Rebuffo 1999, Carámbula 1981). El néctar es secretado en la base de la corola y se extiende sólo de 1,35 a 1,47 mm hacia arriba del tubo

(Free 1965). Las flores se abren durante un período de 6 a 8 días desde la base de la inflorescencia hacia arriba y, según Carámbula (1981), deben ser fecundadas entre el segundo y cuarto día de abiertas, por lo que es necesaria una alta densidad de polinizadores en el cultivo para que las flores puedan ser fertilizadas tan rápido como aparezcan (Palacio 1987). Los estambres y el pistilo se extienden hasta el ápice de la corola pero están encerrados en los pétalos de la quilla. Cuando una abeja presiona con su cabeza la quilla, las anteras y el estigma quedan en contacto con la abeja usualmente en la parte posterior ventral de la cabeza (Plowright y Hartling 1981, Woodrow 1952). Luego de cada visita los órganos reproductores de la flor vuelven a su posición original, característica que distingue al trébol rojo de otras leguminosas como por ejemplo la alfalfa (Bohart 1957).

Los únicos polinizadores considerados de importancia para el trébol rojo, igual que para otras leguminosas forrajeras, son las abejas (Hymenoptera: Apoidea) (Holm 1966). A diferencia de cualquier otro grupo de insectos, las abejas adultas alimentan a sus crías con polen. Para recolectar suficientes recursos deben mantener una alta tasa de pecoreo (comparado por ejemplo con una mariposa que se detiene en las flores sólo para su propia alimentación) y esto las convierte en excelentes polinizadores (Goulson 2003b, Shepherd *et al.* 2003).

Entre las abejas se destacan como polinizadores eficientes del trébol rojo, las abejas melíferas (*Apis mellifera*), el insecto polinizador más utilizado mundialmente, y los abejorros del género *Bombus*. Una de las características que hacen de estos dos grupos polinizadores eficientes, es que ambos poseen una forma de vida social por lo que tienden a ser mucho más numerosos que las especies solitarias (Goulson 2003a). Según Free (1965), además de estos dos grupos son pocos los insectos capaces de polinizar el trébol rojo. No obstante hay autores que consideran otros géneros de abejas (*Megachile*, *Halictus*, *Andrena*, *Melissodes*) pero, en general, su importancia es poco significativa (Bohart 1957).

El valor relativo de las abejas melíferas y los abejorros en la polinización del trébol rojo ha sido debatido durante décadas (Holm 1966, Bohart 1957). Diversos autores destacan la superioridad de los abejorros, otros apoyan el rol de las abejas melíferas, mientras que muchos señalan la importancia de ambos

grupos teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de cada uno para la polinización del trébol rojo.

La abeja melífera resulta un agente polinizador insuperable debido al gran número que fácilmente puede ser llevado a un cultivo en el momento necesario ya que posee colonias de gran tamaño que son manejadas cómodamente por el hombre (Kearns y Thomson 2001, Martin 1975). El principal problema que presenta esta especie para polinizar el trébol rojo es que normalmente son atraídas por otra flora que rodea al cultivo (Free 1965, Peterson *et al.* 1960). En este sentido, Palacio (1987) demostró que el polen de trébol rojo colectado por colmenas ubicadas en una pradera de esta especie, fluctuó entre el 2 % y el 45 %, observando un marcado efecto de la flora competitiva sobre la que se concentró la mayor cantidad de abejas. En Uruguay, algunas de las especies vegetales que pueden competir con el trébol rojo por las abejas debido a que son buenas alternativas alimenticias para éstas, y a que por lo menos parte de su período de floración coincide con la del trébol rojo son: el lotus (*Lotus corniculatus* L.), muy preferido por las abejas, la flor morada (*Echium plantagineum* L.), el eucalipto (*Eucalyptus* sp) y el trébol blanco (*Trifolium repens* L.) (Corbella *et al.* 1995).

Una de las razones principales para que las abejas melíferas se muestren reacias a trabajar en el trébol rojo es que frecuentemente, la probóscide de esta especie, de 5,9 a 6,25 mm de longitud (McGregor 1976), no es lo suficientemente larga para acceder al néctar del trébol rojo y sólo pueden hacerlo cuando las condiciones ambientales (temperatura ambiente y humedad del suelo) permiten que éste sea producido en abundancia (Palacio 1987, Bohart 1957). Por otro lado, de acuerdo con Woodrow (1952) la longitud de la probóscide de la abeja no sería un problema para la polinización del trébol rojo ya que no tiene importancia en la transferencia de polen de una flor a otra porque las partes sexuales de la flor están en su ápice. No obstante, surge la pregunta de hasta qué punto las abejas visitan un cultivo que no las recompensa con néctar. Aun siendo accesible el néctar del trébol rojo para las abejas melíferas, el polen no les resulta lo suficientemente atractivo para la mayoría de las colonias (Holm 1966, Starling *et al.* 1950).

Los abejorros han sido ampliamente reconocidos como excelentes polinizadores del trébol rojo (Heinrich 2004, Goulson 2003a, 2003b, Kearns y

Thomson 2001, Varela y Rebuffo 1999, Brodie 1996, Plowright y Lavery 1984, Michener 1974, Holm 1966, Bohart 1957). Excepto por algunas especies que roban néctar (perforando la base de la corola), son los polinizadores ideales del trébol rojo (Bohart 1957), siendo más eficientes que la abeja melífera. Muchas especies de *Bombus* poseen probóscides largas y por tanto pueden alcanzar el néctar del trébol rojo con facilidad (Heinrich 2004, Goulson 2003a, 2003b, Brodie 1996, Michener 1974) por lo cual representa una fuente importante de alimento. El largo de la probóscide en relación a la longitud de la corola de la flor está asociado con la velocidad y modo de trabajo de una abeja, lo que a su vez determina la eficiencia con la que ésta poliniza una especie vegetal (Holm 1966). Por lo tanto, los abejorros son capaces de visitar más flores por unidad de tiempo que las abejas melíferas (Heinrich 2004, Kearns y Thomson 2001, Plowright y Hartling 1981, Peterson *et al.* 1960, Free 1965) y en consecuencia cada uno poliniza un mayor número de flores. Sumado a esto, en general, los abejorros tienden a trabajar durante más horas del día que las abejas melíferas (Heinrich 2004, Varela y Rebuffo 1999, Michener 1974, Peterson *et al.* 1960) y son capaces de forrajear en un amplio rango de condiciones climáticas (Heinrich 2004, Goulson 2003a, 2003b, Kearns y Thomson 2001). Pueden volar a temperaturas mucho más bajas que las abejas melíferas, trabajando inclusive en días fríos y cubiertos mientras éstas permanecen dentro de la colmena, por lo que son importantes polinizadores en regiones frías y templadas (Heinrich 2004, Goulson 2003a, 2003b, Brodie 1996).

Los abejorros eran considerados de tal importancia que fueron introducidos a Nueva Zelanda (donde no existen especies nativas) entre 1885 y 1906 con el propósito expreso de polinizar el trébol rojo (Heinrich 2004), lo que significó un incremento espectacular en el rendimiento de semillas de esta especie (Holm 1966). Más recientemente, en 1982, *Bombus ruderatus* fue introducido a Chile desde Nueva Zelanda con el mismo objetivo (Ruz 2002).

En Uruguay el 85 % de los productores de semillas de trébol rojo utilizan colmenas de abejas melíferas para la polinización. Con un promedio de dos colmenas por hectárea, logran un rendimiento promedio levemente mayor que los que no las utilizan (120 kg/ha y 105 kg/ha respectivamente), pero igualmente esos

valores están muy por debajo del potencial de la especie (Formoso 2010). Esto demuestra que las abejas melíferas no polinizan satisfactoriamente al trébol rojo en Uruguay. La presencia del género *Bombus* en el país ofrece la posibilidad de utilizar polinizadores más eficientes para incrementar los rendimientos de semilla del trébol rojo.

En este sentido, en INIA La Estanzuela, se realizaron experiencias de producción de semilla de trébol rojo en túneles de aislación comparando el desempeño de *B. bellicosus* y *A. mellifera*. Los resultados mostraron claramente que con los abejorros se obtenían mayores rendimientos de semilla (Varela y Rebuffo 1999). En experiencias a campo también se obtuvieron resultados exitosos: colocando seis colonias de *B. bellicosus* en el centro de una pradera de aproximadamente tres hectáreas se obtuvo un rendimiento promedio, entre distintas parcelas, de 370 kg/ha; cabe mencionar que los rendimientos de las distintas parcela variaron de forma importante, entre 190 y 750 kg/ha, debido a la diferente densidad de inflorescencias entre ellas. En otra experiencia utilizando la misma especie de abejorro se observó que la producción de semilla por hectárea disminuyó al aumentar la distancia a las colonias (Varela y Rebuffo 1999). A pesar de que los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios y alentadores, los trabajos con abejorros se discontinuaron. La experiencia obtenida en otros países empleando a los abejorros como polinizadores en el trébol rojo sumado a los trabajos nacionales constituyen antecedentes relevantes que indicarían que en Uruguay es factible mejorar sustancialmente la producción de semillas de trébol rojo utilizando eficientemente a los abejorros nativos.

### **1.3. CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS**

A principio del siglo XX, el interés de investigadores por ampliar el conocimiento acerca de diversos aspectos de la biología de los abejorros impulsó el comienzo de la cría artificial de colonias de abejorros, ya que las observaciones a campo no eran suficientes para obtener información de por ejemplo el inicio de la colonia, la construcción del nido, el desempeño de tareas dentro del nido por parte de las diferentes castas, entre otros temas. En 1912, Sladen fue el primero en

reportar resultados exitosos, logrando obtener colonias de algunas especies europeas del género a partir de reinas recolectadas al finalizar su hibernación y confinadas a recintos artificiales con suplementación de alimento y material aislante. Al mismo tiempo y en años siguientes, diversos investigadores obtuvieron resultados similares en otras especies europeas y norteamericanas empleando básicamente la misma técnica pero utilizando diversos diseños de recintos, distintos materiales de aislamiento, diferentes formas de estimular a las reinas y varias formas de mantener a las reinas durante su hibernación (Frison 1927, Plath 1923). A lo largo del siglo XX, varios estudios contribuyeron a mejorar la técnica de cría, desarrollando métodos para controlar cada uno de los pasos del ciclo de vida de los abejorros y así alcanzar un completo proceso de domesticación. Entre éstas se pueden destacar los avances obtenidos en la década del 60 en cuanto a las condiciones adecuadas de temperatura, iluminación y humedad para inducir a las reinas a iniciar una colonia (Velthuis y van Doorn 2006, Plowrigh y Jay 1966) lo que permitió la cría en total confinamiento y potencialmente su realización durante todo el año. Esta mejora llevó a abandonar el uso de material aislante durante la etapa de confinamiento de las colonias y por tanto permitió una mejor observación y consiguiente monitoreo de las mismas. Lograr el apareamiento de machos y hembras en laboratorio también fue un paso importante en la domesticación de los abejorros (Duchateau 1985). El desarrollo de una metodología que permitió evitar o cortar la diapausa de las reinas (Röseler 1985) fue un progreso muy importante ya que posibilitó la generación de un sistema de cría continuo a lo largo del año. Luego de varias décadas de investigación, la domesticación de los abejorros fue un hecho (Velthuis y van Doorn 2006).

A pesar de algunos cuestionamientos acerca de la factibilidad económica de la cría de abejorros a gran escala debido principalmente a los altos costos de producción, a fines de los 80 se inicia en los Países Bajos la comercialización de colonias de abejorros para la polinización de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en invernadero, principal cultivo en el que son utilizados hasta la actualidad (Velthuis y van Doorn 2006, Velthuis 2002). Por diversas razones el uso de abejorros para polinizar dicho cultivo fue económicamente rentable y rápidamente

la comercialización de colonias se expandió principalmente por Europa y América del Norte, así como también por varios países asiáticos, Nueva Zelanda y Chile (Velthuis y van Doorn 2006). En el transcurso de los años se amplió el número de cultivos para los cuales se utilizan abejorros como polinizadores. Actualmente las colonias son comercializadas tanto para cultivos en invernadero como a campo entre los que se encuentran diversas hortalizas, frutales y forrajeras (Estay 2007, Velthuis y van Doorn 2006, Matheson 1996).

Desde el comienzo de la comercialización han surgido numerosas empresas productoras de colonias de abejorros; no obstante tres grandes compañías instaladas en varios países son las encargadas cubrir la mayor parte del mercado e incluso abastecer a centros de investigación (Velthuis y van Doorn 2006). A pesar que los aspectos generales de la técnica de cría son de dominio público debido a las diversas publicaciones científicas, los detalles que la hacen eficiente no son totalmente conocidos. Cada uno de los productores comerciales de abejorros ha perfeccionado y mecanizado la técnica de cría y manejo generando sus propios sistemas de cría, información que es mantenida en secreto (Velthuis y van Doorn 2006).

En las últimas décadas centros de investigación en distintas partes del mundo han continuado la investigación buscando mejorar la técnica de cría para hacerla más eficiente, generalmente trabajando con *B. terrestris*. Varios trabajos se han focalizado en evaluar o desarrollar diferentes métodos de estimulación de la reina para que inicie un nido (Kwon *et al.* 2006, 2003, Gretenkord y Drescher 1997). Otros investigadores se han enfocado en el estudio de la diapausa de las reinas (Beekman *et al.* 1999, 1998), uno de los temas que aún necesita mayor conocimiento para un mejor control de esta etapa tan crítica para la cría continúa de abejorros. Diversos estudios han evaluado diferentes factores y condiciones que influyen en las distintas etapas del ciclo de cría. Se han determinado la temperatura y humedad relativa necesarias durante la hibernación artificial de reinas (Yoon *et al.* 2010a), así como las condiciones de luz en los días previos al inicio de la colonia (Yoon *et al.* 2010b) que resultan en un mayor éxito de cría. También ha sido evaluada la influencia del régimen de luz sobre la regulación del tamaño corporal de las obreras (Amin y Kwan 2011b) y sobre el éxito de

apareamiento en condiciones controladas (Amin y Kwan 2011a). Incluso existen trabajos, como el de Jie *et al.* (2005) en China, en el cual se evalúan varias etapas del proceso de cría a distintas condiciones, estableciendo las más óptimas para la cría a lo largo del año. Adicionalmente, hay trabajos que revisan los distintos factores y condiciones que deben controlarse para el mantenimiento de las colonias maduras en buen estado (Duchateau 2006, van Doorn 2006).

Hasta donde se ha consultado no existen patentes para todo el proceso de cría. Existen patentes para determinados procedimientos o materiales que pueden hacer al proceso completo de cría más eficiente. Por ejemplo, está patentado internacionalmente un método para obtener reinas nuevas tempranamente generando una colonia con obreras en presencia de huevos fertilizados y/o larvas (De Ruijter 1997, van den Eijnde *et al.* 1991, Petronella; US Patent 6062945, EPO Patent 838996), técnica que facilita mucho la cría continua especialmente cuando se hace a gran escala. También está patentada una caja-nido con controlador de temperatura interno, la cual permite la utilización de abejorros para polinización durante todo el año (Otomo, Tezuca; US Patent 5895310).

La información acerca de la metodología general de cría está disponible en numerosos artículos científicos (Amin y Kwan 2011a, 2011b, Yoon *et al.* 2010a, 2010b, Ptacek y Drobna 2006, Velthuis y van Doorn 2006, Kwon *et al.* 2006, 2003, Gretenkord y Drescher 1997, Ptacek 1991, van den Eijnde *et al.* 1991, Röseler 1985) y en libros específicos del tema (Evans *et al.*, 2007) o de temas relacionados (O`Toole 2003, Matheson 1996, Free 1993).

Distintos investigadores utilizan variantes en las distintas etapas que hacen del proceso completo pero en líneas generales la metodología es básicamente la misma y puede resumirse en los siguientes pasos. 1) Inicio de la colonia. La cría puede realizarse a partir de reinas fecundadas recolectadas en el campo en primavera cuando emergen de su hibernación, lo que resulta en un 20 a 50 % de éxito en el inicio de la colonia (Evans *et al.* 2007); o una vez que el sistema de cría está establecido puede hacerse con reinas producto del mismo, que han sido apareadas e hibernadas en condiciones controladas, obteniéndose en estos casos mayor éxito de inicio de colonia (Evans *et al.* 2007). Las reinas fecundadas son confinadas a pequeños cajas-inicio y son aprovisionadas con jarabe al 50 % de

azúcar y “pan de polen” (mezcla de polen fresco de abejas melíferas con jarabe), alimento que debe ser cambiado cada dos días por lo menos. El diseño y el material de las cajas son variados, siendo madera y plásticos los más utilizados. Las medidas interiores en general no superan los 5 x 10 x 15 cm. Las reinas confinadas son mantenidas en total oscuridad o con iluminación roja a temperatura y humedad constantes; los rangos utilizados para estas variables van desde los 27 °C a los 30 °C y desde 50 % a 70 % de humedad relativa. Las reinas pueden ser colocadas solas o pueden utilizarse distintos métodos para una mayor estimulación de la puesta por parte de la reina. Colocar dos reinas juntas, o una reina junto con algunas obreras de su especie o incluso de especies del género, o junto a varias abejas melíferas recién emergidas, o junto a pupas de abejorro e incluso pupas artificiales, son algunos de los métodos que han sido utilizados. Una vez que la reina comienza a oviponer la cantidad de alimento suministrado va aumentando gradualmente, continuándose este incremento al emerger las obreras. Cuando la primer camada de obreras ha emergido (de 4 a 8 obreras), la colonia es transferida a cajas-nido de mayor tamaño. El diseño y el material de estas cajas-nido también son variables y muchas veces depende de la utilidad que se le dará a la colonia. Nuevamente madera y plásticos son los materiales más frecuentemente utilizados y las dimensiones interiores son en general no menores a 20 x 20 x 15 cm. El nido puede mantenerse cerrado a temperatura controlada y provisto con suficiente alimento, o puede ser trasladado al campo y permitir a las obreras pecorear libremente para abastecer a la colonia.

2) Obtención de reproductores y apareamiento. Luego de su desarrollo normal las colonias alcanzan su madurez y comienzan a producir machos y nuevas reinas. Estos son capturados y colocados en jaulas de apareamiento de 40 x 40 x 60 cm, o mayores, a razón de dos machos por reina evitando el apareamiento entre hermanos. Estas jaulas se colocan a temperatura ambiente bajo luz solar o iluminación artificial intensa ya que estas condiciones promueven el éxito de apareamiento. Se controlan periódicamente y las reinas apareadas van siendo separadas y alimentadas con jarabe.

3) Hibernación de las reinas. Las reinas fecundadas son mantenidas a una temperatura entre 3 y 5 °C y una humedad relativa mayor a 60 %. La forma de almacenamiento puede variar en cuanto al material y tamaño de los recipientes

utilizados, a la utilización o no de un sustrato como la turba para controlar la humedad y al número de reinas confinadas juntas. Las reinas pueden ser mantenidas en esas condiciones por diferentes períodos de tiempo, siendo el máximo aproximadamente 6 meses que es el período aproximado de hibernación natural. 4) Evitación o interrupción de la diapausa. Para comenzar un nuevo ciclo de cría en cualquier momento del año (independientemente del ciclo natural de los abejorros) las reinas fecundadas son estimuladas mediante la narcotización con dióxido de carbono. Esto puede realizarse para evitar la entrada de reinas en diapausa o para terminar la diapausa en reinas que han hibernado por distintos períodos de tiempo.

Siguiendo esta técnica general, adaptándola y perfeccionándola para las distintas especies de acuerdo a sus requerimientos, se conseguiría la cría artificial de abejorros a lo largo del año.

La mayoría de las especies que han sido y son criadas artificialmente en la actualidad, tanto para investigación como para su comercialización, son de origen euroasiático y norteamericano. La principal, es la especie euroasiática *Bombus terrestris*, que incluso es comercializada fuera de su rango geográfico natural llegando a Japón, China, Chile y Nueva Zelanda (Velthuis y van Doorn 2006). Conociendo el riesgo que puede traer la introducción de especies exóticas (competencia con especies nativas, introducción de nuevos parásitos y enfermedades, entre otros) (Dafni *et al.* 2010, Goulson 2010a, Inoue *et al.* 2008, Goulson 2003a, de Ruijter, 1997), la mejor estrategia es intentar utilizar las especies nativas (Evans *et al.* 2007, Ings *et al.* 2006). La principal dificultad para esto es que se debe adecuar la técnica para la cría de las especies nativas. Desde el comienzo de la domesticación de los abejorros es claro que no todas las especies pueden ser criadas con la misma facilidad (Plath 1923). En este sentido, es sabido que la cría en condiciones controladas de las especies pertenecientes al grupo denominado “hacedores de bolsillo” (se refiere a la forma en que las crías son alimentadas), es más complicada y demandante que la del otro grupo denominado “almacenadores de polen” al cual pertenecen las 5 especies comercializadas en el mundo (Ptacek y Drobna 2006, Velthuis y van Doorn 2006, Griffin *et al.* 1991, Plath 1923). Las especies sudamericanas, incluidas *B. atratus* y *B. bellicosus*

presentes en Uruguay, pertenecen al grupo “hacedores de bolsillo”. A pesar de las dificultades, es posible criar estas especies adecuando y mejorando la técnica, existiendo experiencias de cría exitosa en Brasil (Garófalo 1979), Colombia (Cruz *et al.* 2008, Aldana *et al.* 2007) y en Chile (*Patricia Estay, comunicación personal, 20 de octubre del 2009*). En el caso de Chile la técnica de cría de su especie nativa *B. dalhbomii* se encuentra en proceso para obtener la patente (*Patricia Estay, comunicación personal, 20 de octubre del 2009*).

En Uruguay también hay experiencias de cría en laboratorio con resultados esperanzadores. La primera experiencia la realizaron Varela y Rebuffo (1999) en los años 90. Siguiendo la técnica sugerida en la bibliografía del momento lograron que un alto porcentaje de las reinas utilizadas ovipusieran, llegando al estado larval un 65,2 % de las posturas y al estado adulto un 13 % de la misma. A pesar de obtener resultados exitosos los trabajos fueron discontinuados. Luego de una década, en la Facultad de Ciencias un grupo de investigación, siguiendo la técnica sugerida en la bibliografía y las recomendaciones de técnicos chilenos, inició una cría en laboratorio a pequeña escala de las dos especies nativas de abejorros más comúnmente encontradas en el país.

#### **1.4. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA A SER ABORDADO Y RELEVANCIA DEL MISMO PARA EL SECTOR PRODUCTIVO**

El trébol rojo es una de las principales leguminosas forrajeras utilizadas en Uruguay para la alimentación del ganado. Aunque en el país se produce semilla el rendimiento promedio de semilla (120 kg/ha), se encuentra lejos de su potencial biológico, que obedece en parte a la dificultad de polinizar eficientemente esta leguminosa. Este trabajo está dirigido a superar esta dificultad utilizando como agentes polinizadores a dos especies nativas de abejorros: *Bombus atratus* y *B. bellicosus*. El principal problema de la polinización con estos insectos es que generalmente no son suficientemente abundantes para lograr una polinización adecuada y las poblaciones pueden fluctuar de un año a otro, y entre regiones, en respuesta al cambio de las condiciones ambientales. Sin embargo, la densidad de abejorros en una plantación puede aumentarse preservando y fomentando lugares

propicios para la anidación y/o extrayendo nidos naturales y ubicándolos en cajas de madera especialmente diseñadas que permiten su traslado. Esta última posibilidad ha sido empleada con éxito en por investigadores nacionales pudiendo mantener las colonias en buenas condiciones durante períodos prolongados de tiempo. En esta tesis se pretende utilizar esta tecnología para evaluar la capacidad polinizadora de las dos especies nativas en trébol rojo esperando mejorar el rendimiento de semillas. De encontrarse resultados positivos los semilleristas contarán con la información obtenida conjuntamente con las recomendaciones para incrementar la población de abejorros con el fin de aumentar la producción de semillas.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. Objetivo General**

1. Evaluar la capacidad polinizadora de los abejorros nativos *Bombus atratus* y *B. bellicosus* en el trébol rojo en condiciones de campo.
2. Determinar la metodología adecuada para obtener eficientemente colonias de abejorros nativos *Bombus atratus* y *B. bellicosus* en condiciones de laboratorio.

### **1.5.2. Objetivos Específicos**

2. Estimar la población y determinar el ritmo de actividad de cada colonia trasladada al semillero.
3. Cuantificar el N° de inflorescencias por unidad de superficie durante el período de floración.
4. Cuantificar la densidad de abejorros sobre la pradera de trébol rojo a diferentes distancias de los nidos durante todo el período de floración.
5. Identificar y medir la densidad de otros insectos polinizadores.
6. Determinar el origen botánico del polen colectado por los abejorros durante todo el viaje de pecoreo y el polen y néctar almacenado en los nidos.

7. Cuantificar número de flores e inflorescencias que visita la abeja melífera y ambas especies de abejorros, en un minuto. Se tendrá en cuenta si llevan o no carga de polen.
8. Determinar el rendimiento de semillas por unidad de superficie, de semillas por inflorescencia y el peso de 1000 semillas.
9. Determinar si el rendimiento de semillas se relaciona con la densidad de abejorros.
10. Determinar producción de semilla de trébol rojo en ausencia de polinizadores, en presencia de abejas melífera únicamente y en presencia de abejorros únicamente.
11. Evaluar el método de estimulación de reinas fecundadas para que inicien la construcción de un nido y la oviposición.
12. Evaluar si las condiciones de cautiverio empleadas son adecuadas para promover el crecimiento poblacional de las colonias.
13. Obtener información acerca de la duración y eficiencia de cada una de las etapas de la cría.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD POLINIZADORA**

#### **2.1.1. Aspectos generales**

Las actividades de campo se realizaron durante los meses de marzo y abril del año 2010, en La Estación Experimental La Estanzuela del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA-LE) ubicada en la ruta 50, km 11 del departamento de Colonia (34° 20' S, 57° 41' W). Se utilizó un semillero de 5 hectáreas de trébol rojo del cultivar Estanzuela 116, que se encontraba en su segunda floración. Previo al inicio del trabajo se realizaron las tareas de búsqueda y traslado de nidos de abejorros y el marcado de las parcelas experimentales en la pradera. Durante el período de estudio los diferentes registros se hicieron los días: 6, 12, 17, 22, 27 y 31 de marzo y 7 de abril. El día 12 de abril se realizó el corte del semillero.

Las tareas de laboratorio para determinar el rendimiento de semillas se llevaron a cabo durante los meses de junio y julio del 2010 y el análisis palinológico de las muestras de polen y néctar se hizo de octubre a diciembre del mismo año en el Laboratorio de semillas de INIA-LE y en la Sección Etología de la Facultad de Ciencias, respectivamente.

#### **2.1.2. Obtención de nidos de abejorros**

Durante el mes de febrero se realizó una exhaustiva búsqueda de nidos de abejorros concentrada en los departamentos de Canelones y Montevideo y también en INIA-LE. Una vez localizado un nido se anesthesiaba la colonia con nitrato de amonio liberado con un ahumador. El nido y los abejorros se trasegaban a cajas-nido de madera (20 x 30 x 20 cm). Estas cajas tienen una tapa de vidrio corrediza y un sobretecho de madera (Figura 1). Las cajas se dejaban al menos un día en el lugar donde se encontraba el nido para capturar a todos los abejorros que se encontraban pecoreando y favorecer la adaptación de la colonia. El cierre y traslado de las cajas se hizo de noche para perder la menor cantidad posible de

individuos. Se obtuvieron 10 colonias de diferente tamaño, 7 de *B. atratus* y 3 de *B. bellicosus*, las que fueron trasladadas al semillero y colocadas con la entrada dirigida hacia el cultivo en un extremo y cubriendo el ancho del mismo. También se incluyeron dos colonias de *B. atratus* obtenidas mediante una técnica de cría artificial en laboratorio.



Figura 1. Localización y extracción de colonias naturales de abejorros (A, B). Colonias en cajas de maderas (C). Nidos de abejorros trasladados al semillero de trébol rojo en INIA- LE (D).

Tabla 1. Especie, lugar de localización, población inicial y fecha de traslado al semillero de trébol rojo de las colonias de abejorros utilizadas.

N°	Especie	Lugar de localización	Población inicial	Fecha de traslado
Nido 1	<i>B. atratus</i>	Laboratorio	20	4 de marzo
Nido 2	<i>B. bellicosus</i>	Sauce (Canelones)	120	4 de marzo
Nido 3	<i>B. atratus</i>	Facultad de Agronomía (Mdeo)	80	4 de marzo
Nido 4	<i>B. atratus</i>	Facultad de Ciencias (Mdeo)	150	4 de marzo
Nido 5	<i>B. atratus</i>	Sauce (Canelones)	120	4 de marzo
Nido 6	<i>B. atratus</i>	Laboratorio	20	4 de marzo
Nido 7	<i>B. bellicosus</i>	Sauce (Canelones)	50	10 de marzo
Nido 8	<i>B. bellicosus</i>	Sauce (Canelones)	150	10 de marzo
Nido 9	<i>B. atratus</i>	INIA-LE (Colonia)	100	15 de marzo
Nido 10	<i>B. atratus</i>	INIA-LE (Colonia)	100	15 de marzo
Nido 11	<i>B. atratus</i>	Sauce (Canelones)	50	17 de marzo
Nido 12	<i>B. atratus</i>	Sauce (Canelones)	70	22 de marzo

### 2.1.3. Demarcación de las parcelas experimentales de trébol rojo

Al comenzar la floración se delimitaron 5 parcelas de 2 x 5 m a 40, 80, 120, 160 y 200 metros desde la ubicación de los nidos, resultando en un total de 25 parcelas (Figura 2). El día 4 de Marzo, antes de iniciar los registros, se eliminaron todas las inflorescencias maduras de coloración marrón (posiblemente ya polinizadas) dejando las inflorescencias de color rosado fuerte que son las atractivas para los insectos polinizadores, así como aquellas en las que las flores no habían abierto aún. Las inflorescencias que poseían al menos algunas flores rosado fuerte fueron contadas en cada día de registro de la actividad de los abejorros en la pradera.

### 2.1.4. Instalación de carpas de aislación de insectos

Al comienzo de la floración se colocaron en diferentes puntos del semillero elegidos al azar 9 carpas de 3 x 4 m cubiertas con un tejido de 1 mm de perforación a 1 m de altura para impedir el acceso de insectos sin afectar el normal crecimiento del trébol rojo (Figura 2). En tres carpas se colocó un núcleo de cuatro cuadros de abejas melíferas (8000 obreras aproximadamente), en una

carpa un nido de abejorros *B. atratus* con aproximadamente 100 obreras y las restantes tres carpas permanecieron sin polinizadores. Antes de colocar los nidos dentro de las carpas, se extrajeron todas las inflorescencias maduras que ya habían sido polinizadas.

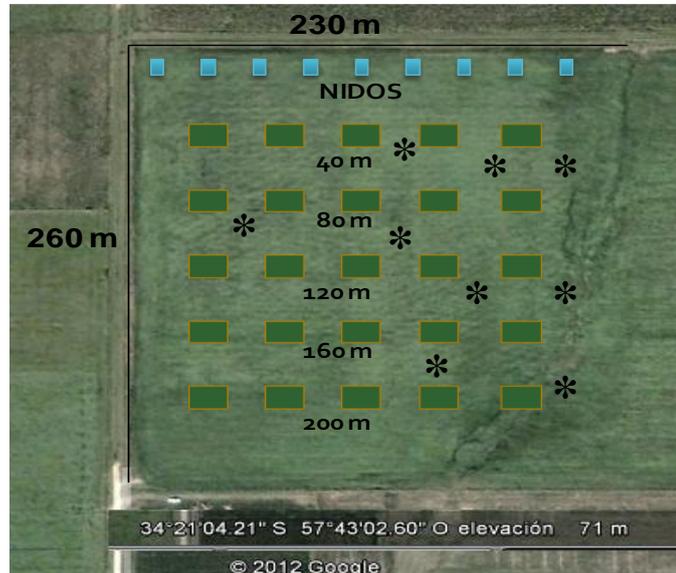


Figura 2. Semillero de trébol rojo de INIA- La Estanzuela. En la imagen se indica la ubicación de los nidos, de las carpas de aislación (señaladas con \*) y de las 25 parcelas a las diferentes distancias.

### 2.1.5. Actividad de los abejorros

La actividad de los abejorros en los nidos y sobre la pradera se evaluó en tres momentos del día: mañana (8-12 hs), mediodía (13-16 hs) y tarde (17-20 hs), durante todo el período de estudio.

#### 2.1.5.1. En los nidos

Para evaluar el ritmo de la actividad de pecoreo de las colonias en los distintos momentos del día, se registró en cada nido durante 15 minutos el número de individuos que salían y entraban, señalando en estos últimos si cargaban polen o no (Figura 3A). Al finalizar este registro se tapó el orificio de entrada a las

cajas-nido y se capturaron algunos abejorros que llegaban cargando polen, los cuales fueron guardados en freezer para posteriormente analizar el origen botánico de la muestra de polen (Figura 3B).

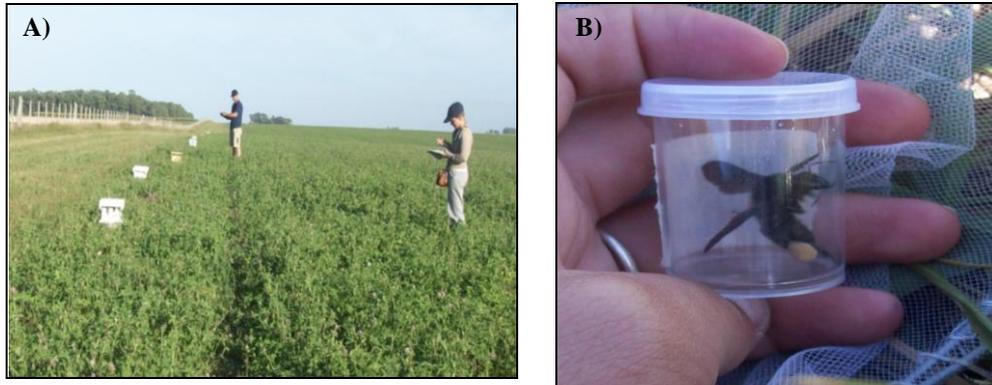


Figura 3. Observación y registro del número de abejorros que entran y salen de los nidos (A). Abejorros capturado al regresar de un viaje de pecoreo con carga de polen (B).

Durante la noche se evaluó el estado de los nidos retirando el sobretecho de madera y observando a través del vidrio con ayuda de una linterna. En esta instancia se contó el número de individuos, identificando obreras, machos y reinas. También se observaba si los nidos tenían puestas de huevos recientes como indicativo del crecimiento de la colonia (objetivo 1) (Figura 4A). Posteriormente, se retiraba la tapa de vidrio y con la mínima luz necesaria se tomaban muestras del polen y néctar almacenados. La extracción de polen se realizó con una pequeña espátula y la de néctar con una jeringa (Figura 4B, C). Las muestras fueron guardadas en freezer hasta su posterior análisis palinológico (objetivo 5).



Figura 4. Observación de los nidos de abejorros (a), presencia de extracción de polen (b) y néctar de “pots” de nidos de abejorros (c).

### 2.1.5.2. En las parcelas experimentales

En cada parcela se registró durante tres minutos, el número de abejorros que estaban pecoreando en las inflorescencias de trébol rojo señalando la especie, la casta y si poseían carga de polen o no. La distinción de las especies de abejorros se realizaron por la coloración que presentan, pudiendo ser los individuos de *B. atratus*; sólo negros (Figura 5 izquierda) o negros con bandas amarillas y *B. bellicosus*; con tórax amarillo y abdomen negro con una terminación marrón claro (Figura 5 derecha). Por su parte, las reinas y los machos son fácilmente discriminados por ser las primeras, de mayor tamaño y los segundos, por poseer antenas más largas y el abdomen más estrecho que las obreras. Además se registraron otros insectos observados pecoreando determinando el grupo al que pertenecen y la especie en los casos que fuese posible.



Figura 5. Individuos de *B. atratus* (izquierda) y *B. bellicosus* (derecha) pecoreando sobre trébol rojo.

### 2.1.5.3. En todo el semillero

De forma complementaria al método anterior, se determinó la densidad de abejorros en todo el semillero. Para ello, se establecieron cuatro transectas ubicadas entre las parcelas a una distancia entre ellas de 10 m. A lo largo de cada transecta se marcaron 11 tramos de 20 m cada uno (220 m total). Las transectas

fueron recorridas a velocidad constante registrando la especie de todo abejorro observado y de ser posible si poseían carga de polen o no.

#### **2.1.6. Colecta de polen en colmenas de abejas melíferas**

Los días 31 de Marzo y 7 de Abril se colocaron trampas cazapolen de piquera en 5 colmenas de un apiario de 30 colmenas ubicado a aproximadamente 700m del semillero de trébol rojo. Las muestras de polen corbicular se guardaron en freezer hasta su posterior análisis palinológico (objetivo 5).

#### **2.1.7. Velocidad de pecoreo de *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera***

Individuos de *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera* con y sin carga de polen fueron seguidos durante 1 minuto, registrando el número de flores e inflorescencias que visitaron (objetivo 6). El número de flores es observable en el campo debido a que tanto el abejorro como la abeja melífera una vez que aterriza en una inflorescencia introduce la probóscide y gran parte de la cabeza para extraer néctar y/o polen, comportamiento que es fácilmente distinguible. A fin de determinar el número de flores visitadas en cada inflorescencia, se analizó el registro realizado el 7 de abril. Siendo este día el que las tres especies se encontraron igualmente representadas.

#### **2.1.8. Rendimiento de semillas**

El 12 de abril la mayoría de las inflorescencias estaban maduras quedando algunas pocas que pudieran resultar atractivas para los abejorros. Para determinar el efecto de los polinizadores en la producción de semillas se evaluó el rendimiento en muestras tomadas de cada parcela y en las carpas (objetivos 7, 8 y 9). Para ello se utilizaron dos cuadrantes de 0,5 x 0,5 m que fueron lanzados uno hacia el lado izquierdo y otro hacia el lado derecho desde el centro de uno de los laterales de cada parcela.

En la superficie encerrada en el cuadrante, se contó el número de inflorescencias maduras e inmaduras, descartándose estas últimas. Toda la biomasa del cuadrante se cortó al ras y fue guardada en bolsas de papel

etiquetadas. Cada muestra fue pesada y puesta a secar en estufa a 35°C durante 48 horas y posteriormente durante otras 48 horas a 40°C. Una vez secas todas las muestras, se volvieron a pesar y se separaron todas las cabezuelas contenidas en las bolsas, agrupando las correspondientes al lado derecho y al lado izquierdo de cada parcela. De cada conjunto se tomaron 10 cabezuelas maduras las que fueron trilladas individualmente y sobre las cuales se realizaron las determinaciones de los componentes de rendimiento a nivel de las inflorescencias (Figura 6).

El resto de las inflorescencias, provenientes de los cuadrantes muestreados, se trillaron utilizando una caja de madera con la superficie interna de goma en la que se colocaron no más de 6 cabezuelas de trébol por vez. La muestra se frotó con un cepillo que también tiene superficie de goma, disociando de esta manera todo el material. Al resultante de este procedimiento se lo limpió en una máquina (Blower) que consiste en un tubo de acrílico en el cuál se activa una corriente de aire ascendente, que permite separar el material seco (muy liviano) de las semillas viables, que son más pesadas. Una vez finalizada la limpieza, se pesó la semilla limpia obtenida y sobre cuatro repeticiones de 100 semillas, utilizando una balanza de precisión, se determinó el peso de 1000 de las semillas. Las semillas inmaduras fueron descartadas.



Figura 6. Selección de cabezuelas maduras de cada parcela (A). Conteo de número de flores de cada inflorescencia (B) y del número de semillas de cada inflorescencias (C).

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

Las muestras de polen de abejas melíferas y las de néctar y polen de abejorros fueron observadas en un microscopio óptico (400 x) (Figura 7). El origen botánico de los granos de polen se determinó utilizando guías palinológicas de referencia. Tanto en las muestras de polen como las de néctar se contaron e identificaron no menos de 200 granos de polen considerando dicha cantidad como representativa de la muestra. De todos modos, una vez alcanzada esta cifra se realizó un recorrido por todo el preparado para descartar la presencia de granos de polen de especies no encontradas anteriormente. Se estableció como criterio descartar aquellas especies cuyos granos de polen estaban presentes en una proporción menor al 5 %, ya que podría tratarse de contaminación.

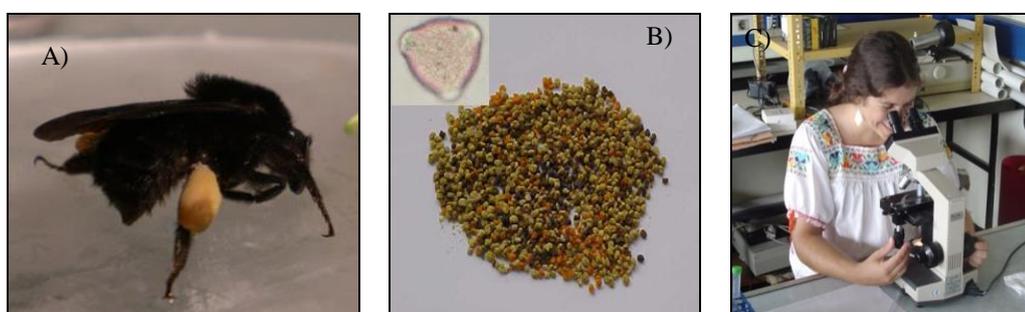


Figura 7. Abejorros con carga de polen (A). Polen corbicular de abejas melíferas (B) e imagen del polen de trébol rojo en un microscopio óptico a 400 x (B). Observación y determinación del origen botánico (C).

### **2.1.10. Análisis estadísticos**

Se tomó como base para el análisis un Modelo Lineal Generalizado (GLM). En etapas posteriores se utilizó el MIXED cuando el análisis consideró algunos efectos como aleatorios, o el GENMOD cuando las variables no cumplían los supuestos del análisis GLM, generalmente debido a que los datos son de conteo mayoritariamente (Littell *et al.* 2007). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS.

## 2.2. CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS

Las experiencias de cría artificial de abejorros se realizaron durante los meses de primavera y verano de los años 2009-2010 y 2010-2011 en la Sección Etología de la Facultad de Ciencias.

La cría se inició con reinas fecundadas de *B. atratus* y *B. bellicosus* recién salidas de su hibernación, capturadas en los meses de primavera mientras se encontraban pecoreando. Las reinas, con no más de 24 horas de capturadas, se colocaban dentro de cajas de madera (cajas de inicio) de 5 x 10 x 10 cm cuyas paredes laterales son de vidrio removible. En un extremo de la caja de inicio se colocaba sobre una pequeña cajita de cartón una pelota de polen de aproximadamente 1,5 - 2 cm de diámetro elaborada con polen corbicular de abejas melíferas y jarabe de azúcar. En un orificio de la parte superior de la caja de inicio se insertaba un dispensador con jarabe de azúcar al 50 %. Las cajas de inicio conteniendo las reinas fueron mantenidas a 28°C en una estufa de 50 x 180 x 50 cm (Figura 8). La fuente de calor de la estufa provenía de lámparas de color rojo, cuya luz no puede ser percibida por los abejorros.



Figura 8. Reinas de *B. atratus* y *B. bellicosus* en cajas de inicio dentro de la estufa a 28°C.

Las tareas de mantenimiento se realizaron con la habitación oscurecida iluminando las cajas con luz roja para evitar perturbar a los insectos. Cada 2-3 días se inspeccionaban las cajas de inicio registrando la situación de las reinas, las obreras y el nido, a la vez que se recambiaba el jarabe de azúcar. Si se

encontraban celdas con el característico bolsillo lateral por donde los abejorros colocan el polen para alimentar a las larvas, éste se llenaba de una pasta de textura cremosa hecha con polen y jarabe de azúcar con ayuda de una jeringa.

Cuando las colonias contaban con aproximadamente 4-8 obreras, se transferían a cajas de madera de 20 x 20 x 40 cm. Estas cajas cuentan con una tapa de madera y una contratapa corrediza de vidrio que permite la observación y un buen acceso a la colonia. Las actividades de mantenimiento básicamente fueron las mismas que en la etapa anterior: recambio de jarabe y alimentación de larvas. Cuando las colonias superaban los 10 individuos se trasladaban al campo terminando con las actividades de mantenimiento.

Para el análisis de los datos se determinaron tres etapas en el proceso de cría:

Etapas 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición (Figura 8).

Etapas 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera (Figura 9 izquierda).

Etapas 3: desde el nacimiento de la primera obrera a la finalización de las actividades de cría (Figura 9 derecha).



Figura 9. Reinas de *B. atratus* en Etapa 2; preparando el pan de polen para realizar la oviposición (izquierda) y en Etapa 3; con algunas obreras nacidas y varias puestas por nacer (derecha).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD POLINIZADORA

##### 3.1.1. Tamaño y ritmo de las colonias de abejorros

En total se instalaron 12 colonias de abejorros (9 de *B. atratus* y 3 de *B. bellicosus*) cuyas poblaciones variaron entre 20 y 150 individuos (Tabla 2). La población del conjunto de las colonias se redujo en torno al 50 % en los días siguientes a su instalación. Sin embargo, luego de esta reducción inicial la población se mantuvo estable durante todo el período de estudio (Tabla 2). Una vez que estuvieron instalados todos los nidos (22 de marzo) la proporción entre *B. atratus* y *B. bellicosus* también se mantuvo estable en el tiempo en torno a 7:3 (Tabla 2).

Tabla 2. Número de abejorros de las colonias instalados en el semillero de trébol rojo a lo largo del período de estudio.

N° nido	Especie	Pobl. inic.	12/3	22/3	27/3	31/3	07/4	12/4
Nido 1	<i>B. atratus</i>	20	13	15	22	16	12	6
Nido 2	<i>B. bellicosus</i>	120	120	70	81	70 <sup>c</sup>	60	36
Nido 3	<i>B. atratus</i>	80	53	15	36	27	19	12
Nido 4	<i>B. atratus</i>	150	120	50	90	120	116	84
Nido 5	<i>B. atratus</i>	120	80	40	66	90	90	80
Nido 6	<i>B. atratus</i>	20	5	10 <sup>c</sup>	16	16	9	14
Nido 7	<i>B. bellicosus</i>	50	23	20	33	34	34	29
Nido 8	<i>B. bellicosus</i>	150	130	90	91	70	67	60
Nido 9	<i>B. atratus</i>	100 <sup>a</sup>		100	70	70	60	47
Nido 10	<i>B. atratus</i>	100 <sup>a</sup>		100	60	80	53	30
Nido 11	<i>B. atratus</i>	50 <sup>a</sup>		15	14	5	9	4
Nido 12	<i>B. atratus</i>	70 <sup>a</sup>		70	28	26	25	11
<b>Total individuos</b>		<b>1030 (710<sup>b</sup>)</b>	<b>544</b>	<b>595</b>	<b>607</b>	<b>624</b>	<b>554</b>	<b>413</b>
<b><i>B. atratus</i> (%)</b>		<b>54,9</b>	<b>49,8</b>	<b>69,8</b>	<b>66,2</b>	<b>72,2</b>	<b>70,9</b>	<b>69,7</b>
<b><i>B. bellicosus</i> (%)</b>		<b>45,1</b>	<b>50,2</b>	<b>30,2</b>	<b>33,8</b>	<b>27,8</b>	<b>29,1</b>	<b>30,3</b>

\*El 17 de marzo no fue posible realizar el registro de población de las colonias debido a lluvia.

a: Estas colonias fueron instaladas entre el 12 y el 22 de marzo. b: Número total de abejorros en las colonias instaladas antes del 12 de marzo. c: Valores estimados.

En relación al ritmo de actividad de los abejorros, el registro de entradas y salidas de los nidos en la mañana, mediodía y tarde no mostró un patrón rígido

(Figura 10). A partir del 17 de marzo los registros se hicieron con la totalidad de nidos ya instalados. Se utilizó el Coeficiente de Correlación de Pearson para relacionar la actividad de los abejorros con la temperatura y la humedad relativa. Se determinó una asociación positiva tanto en el número de individuos entrando, como en el número de individuos saliendo del nido con la temperatura ( $\rho = 0,47$ ;  $P = 0,03$  y  $\rho = 0,45$ ;  $P = 0,04$ , respectivamente), pero no con la humedad relativa ( $\rho = 0,175$ ;  $P = 0,45$  y  $\rho = 0,274$ ;  $P = 0,23$ , respectivamente).

El día 22 de marzo se registró el máximo número de abejorros entrando y saliendo de los nidos coincidiendo con el mayor valor de humedad relativa del período de estudio.

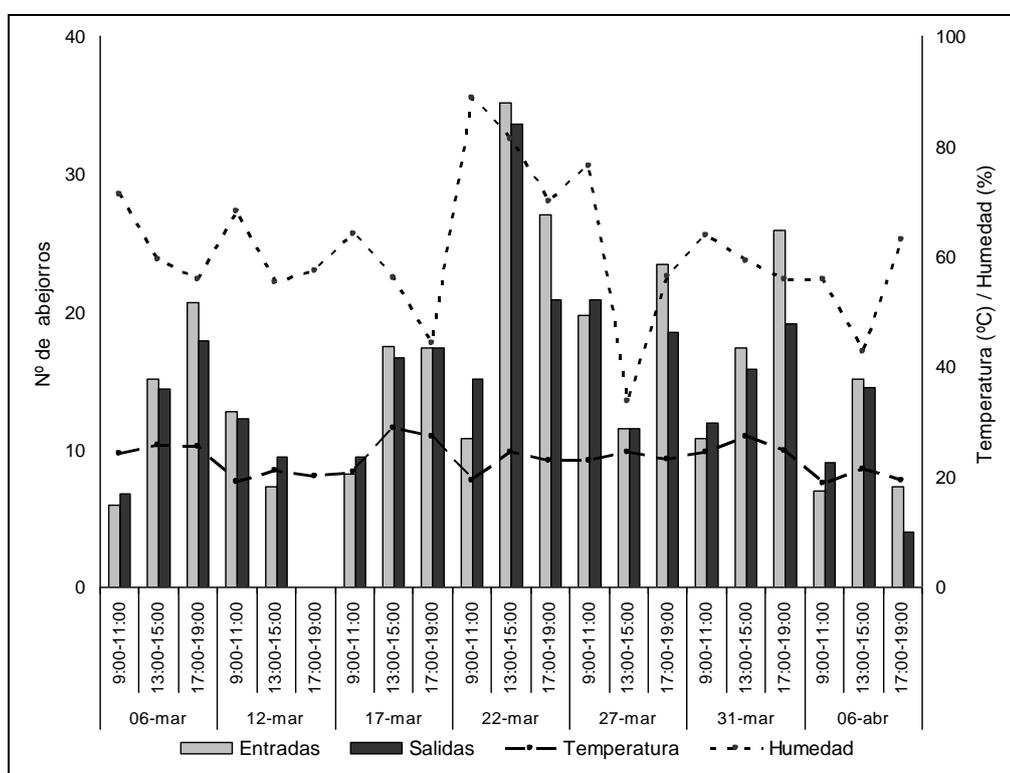


Figura 10. Registro de entradas y salidas de los abejorros en los nidos en diferentes momentos del día y a lo largo del período de estudio. En la tarde del 12 de marzo, no se realizó el registro debido a lluvia. También se presenta la temperatura y la humedad relativa del ambiente durante el período.

### 3.1.2. Evolución de las inflorescencias atractivas en la pradera

El número promedio de inflorescencias de trébol rojo atractivas para los insectos se incrementó en forma sostenida entre el 6 y el 31 de marzo, pasando de

8,9 a 68,5 inflorescencias/m<sup>2</sup> (Figura 11). Luego del 31 de marzo el número de inflorescencias atractivas experimentó una disminución importante llegando a 53 inflorescencias/m<sup>2</sup> el día 7 de abril (Figura 11).

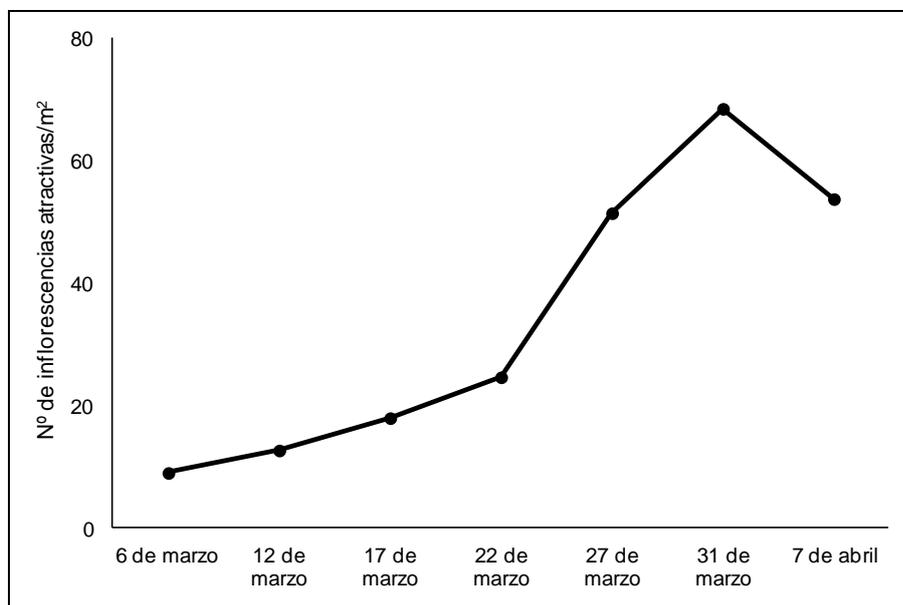


Figura 11. Densidad de inflorescencias atractivas de trébol rojo (número/m<sup>2</sup>) a lo largo del período de estudio. Cada punto resulta de calcular el número de inflorescencias por metro cuadrado a partir del número medio de inflorescencias en las 25 parcelas para cada fecha registrada.

### **3.1.3. Presencia de abejorros en la pradera**

La distribución de los abejorros en función de la distancia a los nidos se analizó con los registros de las parcelas y las transectas utilizando un Modelo Lineal Generalizado (GLM) en el que se consideró a las distancias como variables cualitativas y se incluyó la fecha y la interacción fecha por distancia. El modelo indicó que no había interacción fecha por distancia. El efecto de las distancia en la distribución de los abejorros en la pradera mostró resultados diferentes según se analizaran los individuos observados en las parcelas o en las transectas. En las parcelas no se encontró relación en la densidad de abejorros con la distancia a los

nidos analizando las dos especies juntas ( $F = 1,39$ ;  $P = 0,24$ ) ni separadas (*B. atratus*  $F = 1,41$ ;  $P = 0,22$ ; *B. bellicosus*  $F = 0,39$ ;  $P = 0,82$ ) (Figura 12). En cambio, cuando se analizaron los registros tomados en las transectas se encontró que la distribución variaba con la distancia pero no de forma lineal ( $F = 6,72$ ;  $P < 0,001$ ). Así, el mayor número de abejorros se encontró a 60 m de los nidos y el mínimo a 160 m, siendo esta diferencia de casi 50 % (Figura 12B). Esta tendencia también se observa al analizar cada especie de abejorros por separado (*B. atratus*  $F = 6,41$ ;  $P < 0,001$ ; *B. bellicosus*  $F = 6,14$ ;  $P < 0,001$ ) aunque fue más notoria en *B. atratus* (Figura 12B).

En relación al efecto del horario en la distribución de los abejorros, los registros sobre la pradera muestran que la mayor cantidad de individuos se concentraba en horas del mediodía. Esta tendencia se verificó tanto en las observaciones realizadas en las parcelas ( $F = 4,89$ ;  $P = 0,008$ ) como en las realizadas en las transectas ( $F = 14,36$ ;  $P < 0,001$ ) cuando las especies se consideraban juntas (Figura 12C, D). No obstante, al analizar las especies por separado la densidad de *B. atratus* se relacionó con el horario ( $F = 4,96$ ;  $P = 0,007$  en las parcelas;  $F = 8,17$ ;  $P = 0,0003$  en las transectas) siendo mayor al mediodía, mientras que la densidad de *B. bellicosus* no mostró diferencias a lo largo del día ( $F = 0,48$ ;  $P = 0,62$  en las parcelas;  $F = 1,27$ ;  $P = 0,28$  en las transectas) (Figura 12C, D).

La densidad de abejorros en el semillero incrementó fuertemente a lo largo del período de estudio al analizar las especie conjuntamente ( $F = 31,84$ ;  $P < 0,0001$  en las parcelas;  $F = 79,81$ ;  $P < 0,001$  en transectas) (Figura 12E, F). Al analizar las dos especies de abejorros por separado se verificó la misma respuesta, tanto para *B. atratus* ( $F = 26,51$ ;  $P < 0,001$  en las parcelas;  $F = 74,11$ ;  $P < 0,001$  en las transectas), como para *B. bellicosus* ( $F = 13,26$ ;  $P < 0,001$  en las parcelas;  $F = 30,17$ ;  $P < 0,001$  en las transectas) (Figura 12E, F). Los registros en las transectas muestran que el principal incremento en la densidad de los abejorros ocurrió entre el 22 de marzo y el 27 de marzo (Figura 12E, F).

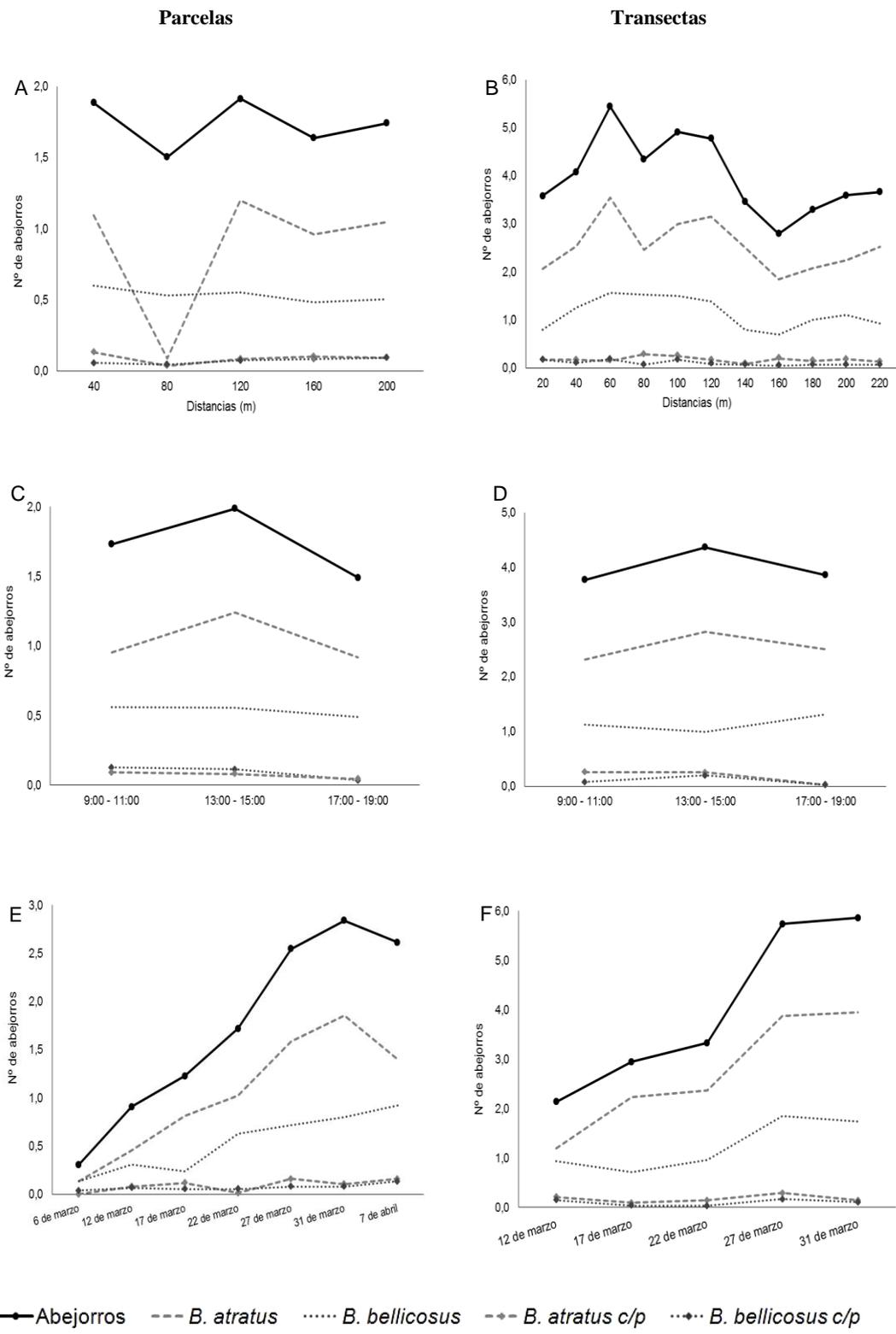


Figura 12. Distribución de los abejorros en las parcelas (izquierda) y en las transectas (derecha), en relación a la distancia a los nidos (A,B), al momento del día (C,D) y a lo largo del período de estudio (E,F).

El número de individuos de *B. atratus* a lo largo del período de estudio fue mayor que el de *B. bellicosus*, a excepción del primer día de registro en el cual estas especies estaban presentes en el semillero en la misma proporción (Figura 12E, F).

Al analizar únicamente los individuos que cargaban polen, no se observó una relación entre la densidad de abejorros y la distancia desde los nidos en *B. atratus* ( $F = 1,24$ ;  $P = 0,29$  en las parcelas;  $F = 1,17$ ;  $P = 0,30$  en las transectas), ni en *B. bellicosus* ( $F = 1,29$ ;  $P = 0,23$  en las parcelas;  $F = 0,49$ ;  $P = 0,74$  en las transectas) (Figura 12A, B).

La densidad de abejorros *B. atratus* que cargaban polen varió en los diferentes momentos del día ( $F = 4,25$ ;  $P = 0,014$  en las transectas;  $F = 25,5$ ;  $P < 0,0001$ ) siendo mayor durante la mañana (Figura 12C, D). En cambio, la presencia de *B. bellicosus* no cambió a lo largo del día cuando se analizaron los registros de las parcelas ( $F = 1,19$ ;  $P = 0,30$ ), pero si cuando se analizaron los registros de las transectas ( $F = 14,91$ ;  $P < 0,0001$ ), siendo mayor en horas del mediodía (Figura 12C, D).

A largo del período de estudio la densidad de *B. atratus* cargando polen varió en las parcelas ( $F = 3,06$ ;  $P = 0,006$ ) y en las transectas ( $F = 5,01$ ;  $P = 0,0006$ ) mostrando una reducción el 22 y 17 de marzo, respectivamente (Figura 12E, F). Por otro lado, la densidad de *B. bellicosus* se mantuvo constante en todo el período según indican los registros de las parcelas ( $F = 0,85$ ;  $P = 0,53$ ), pero varió de acuerdo a los registros de las transectas ( $F = 4,64$ ;  $P = 0,0011$ ) mostrando una mayor presencia de abejorros el 17 de marzo (Figura 12E, F).

Se analizó la presencia de abejorros en la pradera en relación con el número de inflorescencias atractivas presentes en las parcelas encontrándose una asociación de acuerdo a la función:  $y = 0.01x + 1.2393$  ( $F = 162.32$ ;  $P < 0.001$ ) (Figura 13).

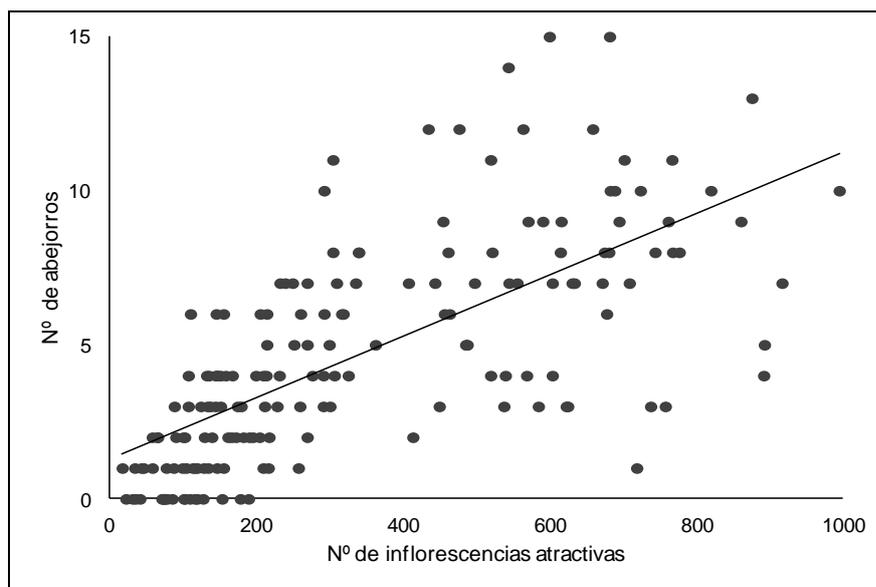


Figura 13. Relación entre el número de abejorros y el número total de inflorescencias atractivas presentes en la parcelas.

### 3.1.4. Otros insectos presentes en la pradera

A lo largo del período de estudio se registraron diversos insectos pertenecientes a los órdenes Hymenoptera, Lepidoptera y Diptera pecoreando en las inflorescencias de trébol rojo. Los lepidópteros fueron los más abundantes durante la primera mitad del mes de marzo, destacándose especialmente la especie *Colias lesbia* perteneciente a la familia Pieridae (Figura 14A). En el resto del período de estudio los abejorros fueron los insectos predominantes. En tercer lugar se destaca la abundancia de *A. mellifera* seguida de especies de abejas solitarias como *Xylocopa augusti* y *X. artifex* (Figura 14B, C). Estas dos últimas especies fueron agrupadas junto a otras especies de himenópteros de poca abundancia en la categoría “otros himenópteros”.



Figura 14. Diferentes insectos que se registraron en las inflorescencias del trébol rojo. A. *Colias lesbia*, B. *Xylocopa augusti*, C. *Xylocopa atifex*.

El día 22 de marzo, ocurrió un cambio en la densidad de los distintos insectos en la pradera (Figura 15). A partir de esa fecha aumentó significativamente la presencia de *A. mellifera* ( $F = 7,37$ ;  $P < 0,001$ ) y de otros himenópteros ( $F = 24,79$ ;  $P < 0,001$ ), mientras que la densidad de lepidópteros disminuyó significativamente ( $F = 13,89$ ;  $P < 0,001$ ). Los dípteros estuvieron presentes en muy baja proporción durante todo el período de estudio pero se encontraron en mayor proporción al final del mismo ( $F = 2,26$ ;  $P = 0,0366$ ) (Figura 15).

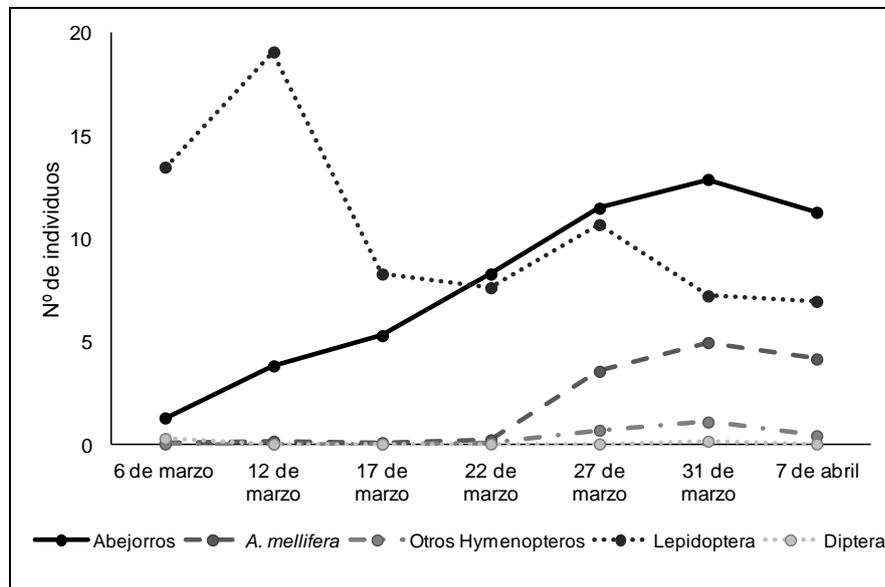


Figura 15. Presencia de los diferentes grupos de insectos observados pecoreando sobre el trébol rojo en las parcelas a lo largo del período de estudio.

### **3.1.5. Origen botánico del néctar y el polen colectados por los abejorros y las abejas melíferas**

El 31 de marzo y el 7 de abril se tomaron muestras del polen almacenado en los pots de los nidos de abejorros. El análisis palinológico indicó que el polen de trébol rojo fue el recurso principal en la muestra tomada el 31 de marzo, representando el 61,3 %. El resto de la muestra se conformaba por las familias Solanaceae (15 %), Papilionoidea (5,7 %) y Apiaceae (3,3 %), los eucaliptos (2,3 %) y varios grupos en muy baja proporción que agrupados constituyeron el 12,3% de la muestra (Figura 16A). Por otro lado, en la muestra tomada el 7 de abril las solanáceas estuvieron representadas en mayor proporción (40,3 %) siendo el trébol rojo un recurso secundario (38,7 %). El resto de la muestra perteneció a la familia Papilionoidea (16,3 %) y a otros recursos de menor importancia (4,7 %) (Figura 16A).

El análisis de las muestras del néctar almacenado en los nidos, tomadas los días 31 de marzo, 7 y 12 de abril, mostró que el trébol rojo fue el recurso predominante, constituyendo entre el 95 y el 100 % de las muestras. En las tres ocasiones, los recursos restantes, que incluyen solanáceas y asteráceas, no alcanzaron el 5 % (Figura 16B).

El 31 de marzo y el 12 de abril se tomaron muestras de polen corbicular de las abejas melíferas encontrando que el ingreso de polen de trébol rojo fue menor en el primer muestreo (27,5 %) en relación al segundo (46,3 %), aunque en ambos la mayor proporción de polen perteneció a la familia Asteracea (56,9 y 49,8 %, respectivamente). También se encontraron otros recursos poliníferos representados en una proporción menor al 5 % (Figura 16C).

Los días 17 y 31 de marzo, y 7 y 12 de abril se capturaron abejorros que retornaban al nido cargando polen. El análisis palinológico de las muestras de polen corbicular mostró que la colecta de polen de trébol rojo disminuyó sostenidamente desde el 17 de marzo al 7 de abril (de 75 a 28 %), pero se incrementó fuertemente (a más del 80 %) el 12 de abril. Complementariamente a

la utilización de trébol rojo, en los primeros tres registros las solanáceas aparecieron como el segundo recurso más utilizado, y en el último fueron, las asteráceas. En menor proporción los abejorros colectaron polen de aliáceas y papilionoideas el 31 de marzo y el 7 de abril, respectivamente (Figura 16D).

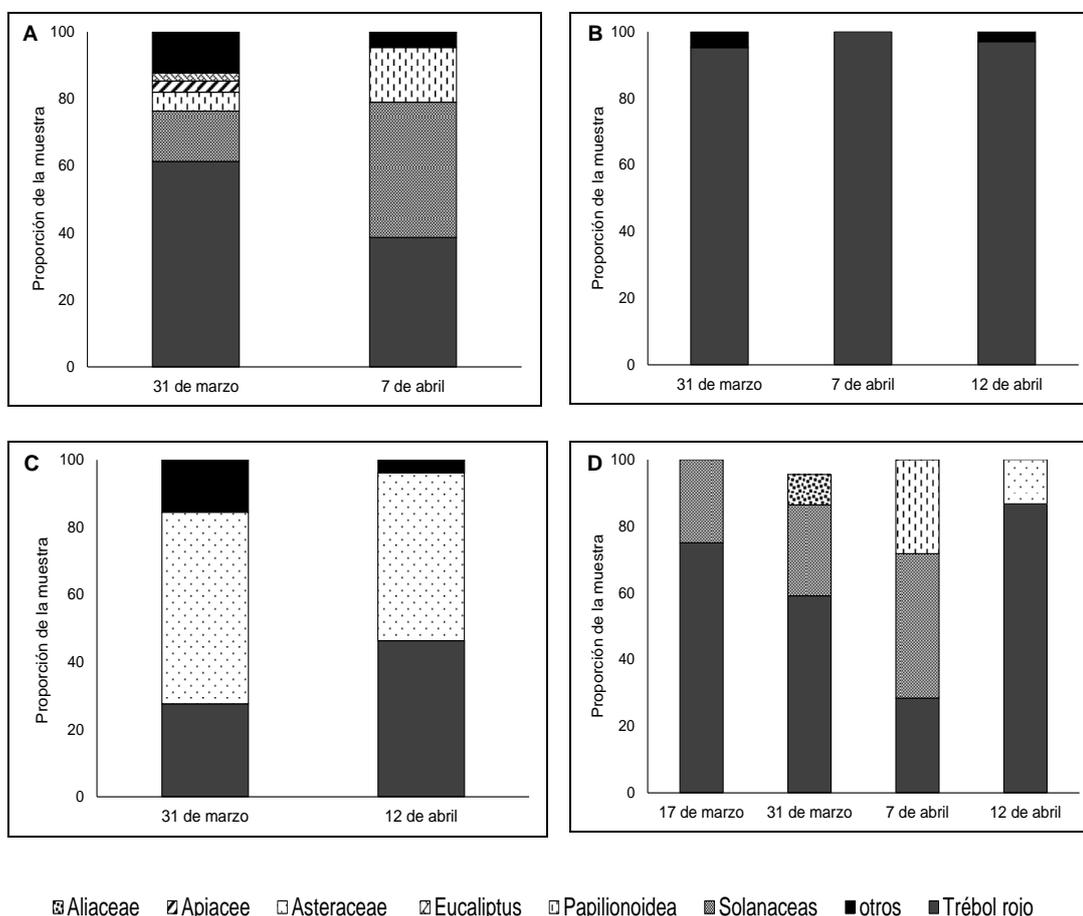


Figura 16. Proporción de polen de trébol rojo en muestras del polen almacenado en nidos de abejorros (A), en muestras del néctar almacenado en nidos de abejorros (B), en muestras del polen corbicular de abejas melíferas (C) y en muestras del polen corbicular de abejorros (D).

### 3.1.6. Velocidad de pecoreo de *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera*

El número de inflorescencias y flores totales visitadas en un minuto fue registrado para *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera*. Las tres especies visitaron algo más de 5 inflorescencias sin encontrar diferencias significativas entre ellas ( $F = 0,98$ ;  $P = 0,38$ ). Sin embargo, *B. atratus* y *B. bellicosus* visitaron 24 y 21 flores,

respectivamente, superando ampliamente a *A. mellifera* que visitó 8 flores ( $F = 210,61$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 17).

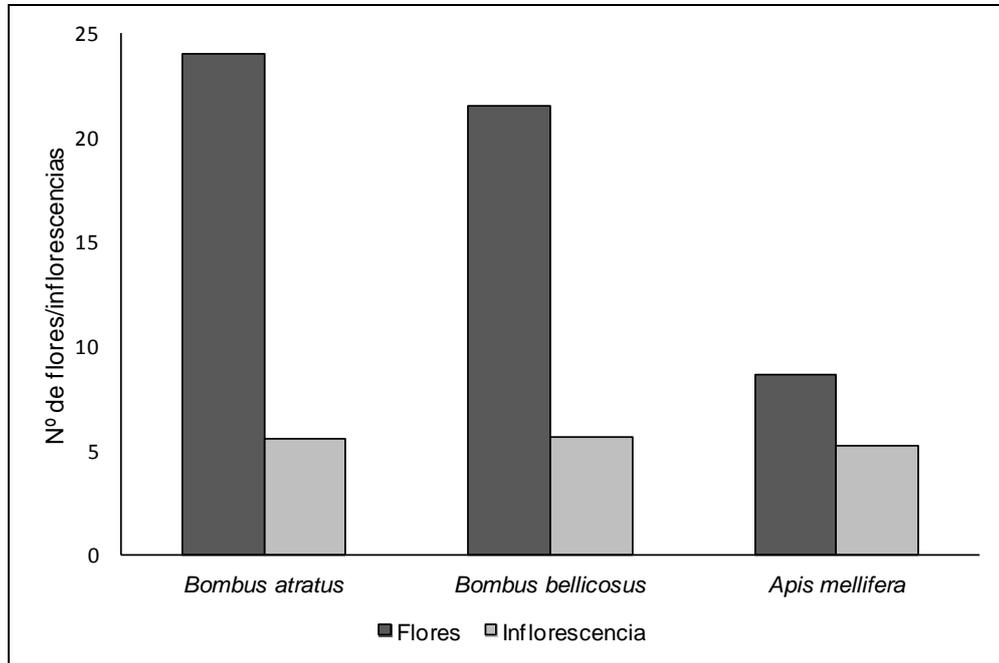


Figura 17. Media (obtenida del análisis por GLM) del número de flores e inflorescencias de trébol rojo visitadas durante un minuto por individuos de *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera*.

El 7 de abril se realizaron seguimientos de 15 individuos de cada una de las especies: *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera*, registrando el número de inflorescencias y el número de flores visitadas en cada inflorescencia. *B. atratus* fue la especie que visitó un mayor número de flores por inflorescencias, seguido por *B. bellicosus* y luego por *A. mellifera* ( $F = 30,99$ ;  $P < 0,001$ ). Sin embargo, *B. bellicosus* fue la especie que visitó mayor número de inflorescencias, seguida de *B. atratus* y *A. mellifera* ( $F = 104,3$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 17).

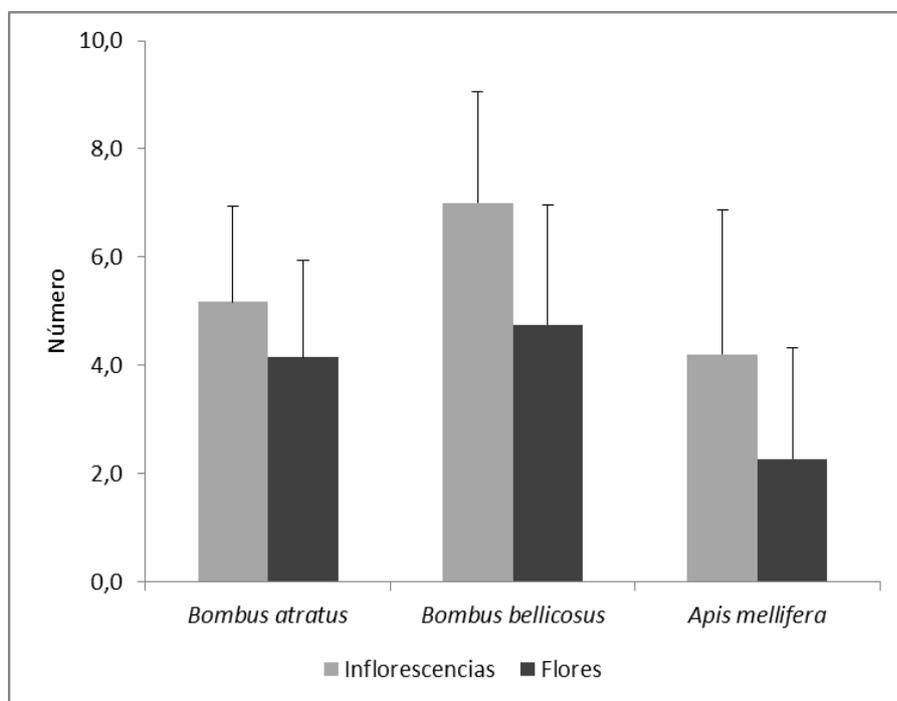


Figura 18. Números de inflorescencias y número de flores por inflorescencias de trébol rojo visitadas durante un minuto por *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera*.

### 3.1.7. Rendimiento de semillas

#### 3.1.7.1. En las parcelas experimentales

Para cada una de las 25 parcelas experimentales se obtuvieron indicadores de rendimiento de la producción de semillas. En la Tabla 3 se presentan los datos para cada parcela y en la Tabla 4 los valores de los estadísticos descriptivos para el conjunto de las parcelas.

Utilizando el Coeficiente de Correlación de Pearson, se determinó la asociación de los diferentes indicadores de rendimiento con la presencia de los abejorros. No se encontró ninguna asociación entre el número de abejorros y las semillas/inflorescencia ( $\rho = 0,134$ ;  $P = 0,52$ ), las flores/inflorescencia ( $\rho = 0,205$ ;

P = 0,33), o el peso de 1000 semillas ( $\rho = 0,04$ ; P = 0,85). En cambio, sí se encontraron asociaciones significativas entre el número de abejorros y el resto de los indicadores de rendimiento: número de inflorescencias maduras/m<sup>2</sup> ( $\rho = 0,394$ ; P = 0,05), número de inflorescencias/m<sup>2</sup> ( $\rho = 0,421$ ; P = 0,04), porcentaje de materia seca ( $\rho = 0,428$ ; P = 0,033) y peso de semillas (g/m<sup>2</sup>) ( $\rho = 0,430$ ; P = 0,03).

Tabla 3. Indicadores de rendimiento de la producción de semillas de trébol rojo para cada parcela experimental. La distancia de las parcelas a los nidos de abejorros es la siguiente: parcelas 1 a 5, (40 m), parcelas 6 a 10 (80 m), parcelas 11 a 15 (120 m), parcelas 16 a 20 (160 m) y parcelas 21 a 25 (200 m).

Parcelas	Indicadores de Rendimiento						
	Semillas/ inflorescen (%)	Nº flores/ inflorescen	Nº inflorescen /m <sup>2</sup>	Nº Inflorescen maduras/m <sup>2</sup>	Peso de 1000 semillas (g)	Peso de semillas (g/m <sup>2</sup> )	Materia seca (%)
1	82,5	110,6	396	274	1,74	7,86	29,6
2	45,2	94,9	162	110	1,62	2,78	29,6
3	45,82	90,73	284	201	1,64	3,86	35,1
4	69,8	105,6	480	398	1,81	14,24	40,6
5	74,7	93,6	388	298	2,08	9,24	34,91
6	83,7	114	338	280	1,88	12,38	35,25
7	66,6	119,8	390	294	1,76	10,7	35,57
8	48,11	96,44	422	335	1,78	11	29,86
9	69,2	116	198	128	1,69	3,04	24,14
10	71	106,4	258	179	1,75	5,08	36,11
11	62,9	98,7	322	241	1,58	8,4	34,4
12	94,33	124,44	476	367	1,73	10,22	32,68
13	62,56	104,89	222	169	1,71	5,26	32,25
14	57,6	102,5	340	263	2,02	10,76	31,81
15	59,2	90,1	250	175	1,67	3,78	32,15
16	50,3	68,6	122	91	1,8	2,04	27,18
17	69,89	93	140	96	1,55	3,28	22,19
18	67,8	97,2	168	102	1,85	3,14	22,85
19	61,7	111,5	264	158	1,84	3,86	23,5
20	75,9	136,1	314	231	1,68	6,88	29,44
21	77,33	128,44	336	269	1,78	13,22	35,37
22	96,4	120,5	272	201	1,77	8,4	32,13
23	86,8	118,6	304	216	1,37	8,9	28,88
24	54	109,2	264	175	1,83	6,1	27,15
25	73,8	100,4	308	242	1,87	9,8	27,15

Tabla 4. Valores promedio, desvío estándar (DE) y rango de los indicadores de rendimiento de la producción de semillas de trébol rojo determinados para las 25 parcelas experimentales.

Indicadores de rendimiento	Promedio	DE	Rango
Semillas/inflorescencia (%)	68,9	8,59	54,6 - 88,5
Nº de flores/inflorescencia	106,09	14,62	68,6 – 136,1
Nº de inflorescencias/m <sup>2</sup>	296,72	97,10	122,0 – 480,0
Nº de inflorescencias maduras/m <sup>2</sup>	219,72	83,99	91,0 – 398,0
Peso de 1000 semillas (g)	1,75	0,14	1,37 – 2,08
Peso de semillas (g/m <sup>2</sup> )	7,38	3,58	2,08 – 14,14
Materia seca (%)	30,79	4,70	22,19 – 40,60

La correlación entre el número de abejorros y el peso de semillas (g/m<sup>2</sup>) sigue la función de regresión: Rendimiento = 1,06 + (0,57 x N° abejorros). Esto significa que por cada dos abejorros que visitaron la parcela el peso de semillas (g/m<sup>2</sup>) se incrementó en una unidad (Figura 19).

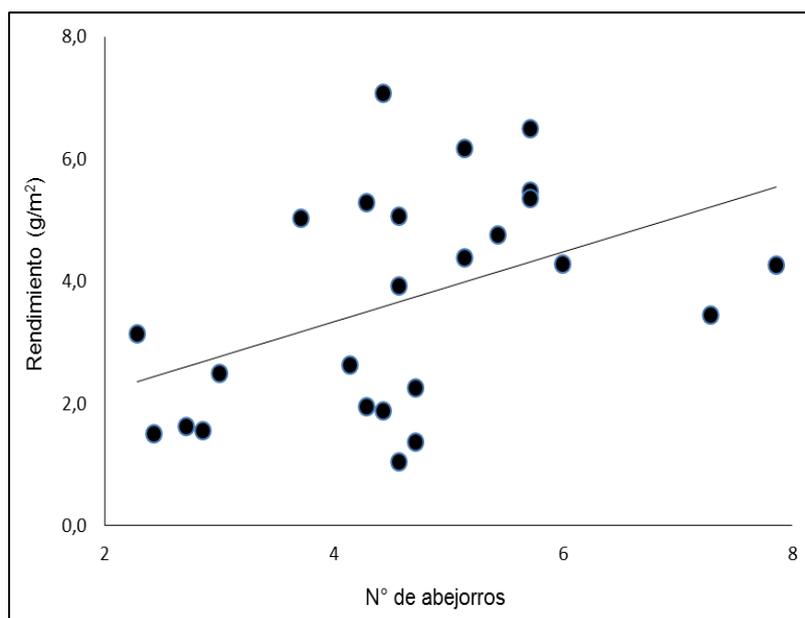


Figura 19. Relación entre peso de semillas (g/m<sup>2</sup>) y la presencia de abejorros en las parcelas.

### 3.1.7.2. En las carpas

Las 9 parcelas cubiertas por carpas de tejido instaladas en el semillero fueron repartidas en tres grupos: control (4), polinizadas con abejas melíferas (4) y polinizadas con abejorros (*B. atratus*) (1). En la mitad del período de estudio una tormenta rompió una carpa del grupo control y una que contaba con un núcleo de abejas. Estas dos carpas fueron excluidas del análisis.

La Tabla 5 muestra los diferentes indicadores de rendimiento en la producción de semillas del trébol rojo para las parcelas cubiertas. En la carpa con abejorros el trébol rojo presentó el mayor valor en el porcentaje de semillas/inflorescencias y en el peso de semillas ( $\text{g}/\text{m}^2$ ). Sin embargo, sólo para este último indicador se pudieron verificar diferencias estadísticamente significativas ( $F = 12,54$ ;  $P = 0,019$ ) (Figura 20).

Tabla 5. Indicadores de rendimiento en las parcelas cubiertas por carpas asignadas a los siguientes tratamientos: control (3), polinizadas con abejas melíferas (3) y polinizadas con abejorros (1).

Tratamiento	MS (%)	Infl./m <sup>2</sup>	Flores/Infl.	Infl. mad./m <sup>2</sup>	Sem/Infl(%)	P1000	PS/m <sup>2</sup>
Control	27,13	200,0	98,86	40,66	19,34	2,16	2,37
Abejas melíferas	29,41	286,0	100,58	86,66	32,82	1,90	5,93
Abejorros	32,78	360,0	111,20	230,00	77,43	1,76	19,88

MS (%): Materia seca, Infl./m<sup>2</sup>: Número de inflorescencias por metro cuadrado, Flores/Infl.: Número de flores por inflorescencia, Infl. mad./m<sup>2</sup>: Inflorescencias maduras por metro cuadrado, Sem./Infl. (%): Semillas por inflorescencias, P1000: Peso de mil semillas, PS/m<sup>2</sup>: Peso de semillas por metro cuadrado.

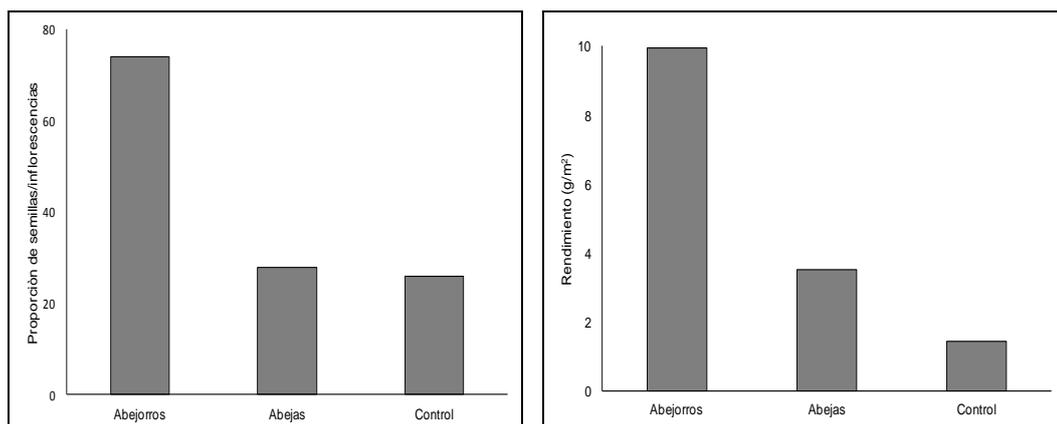


Figura 20. Proporción de semillas por inflorescencias (izquierda) y rendimiento medido como peso de semillas por metro cuadrado (derecha) en las parcelas cubiertas por carpas en los tratamientos asignados: polinizadas con abejorros (1), polinizadas con abejas melíferas (3) y control (3).

### 3.2. CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS

La experiencia del período 2009-2010 se inició con 42 reinas (40 de *B. atratus* y 2 de *B. bellicosus*) y la del período 2010-2011 con 89 reinas (82 de *B. atratus* y 7 de *B. bellicosus*).

A lo largo del proceso de cría el número de reinas que pasaban a las etapas 2 y 3 fue disminuyendo, verificándose la mayor reducción entre las etapas 1 y 2 (Figura 21). La experiencia del período 2010-2011 fue más eficiente que la del período 2009-2010 presentando un incremento en el número de reinas que tuvieron al menos una obrera (30,3 y 21,5%, respectivamente) (Figura 21).

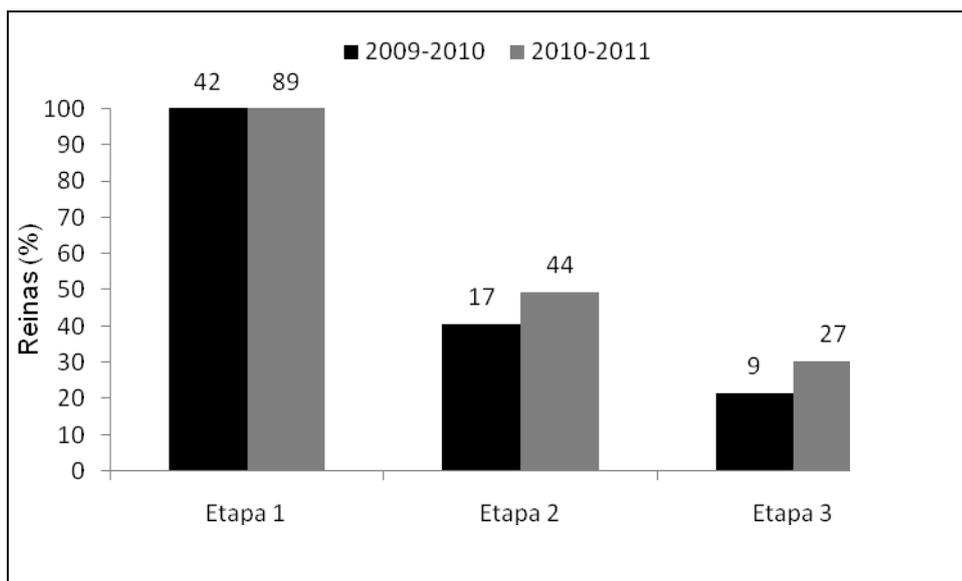


Figura 21. Porcentaje de las reinas iniciales en cada una de las etapas del proceso de cría. Etapa 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición. Etapa 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera. Etapa 3: desde el nacimiento de la primera obrera a la finalización de las actividades de cría.

Durante la experiencia del período 2009-2010 murieron 27 reinas (64,3 % del número inicial) y en la del período 2010-2011 murieron 48 reinas (53,9 % del número inicial). La Figura 22 muestra cómo se distribuyeron las reinas muertas entre las tres etapas de la cría. El mayor número de pérdidas de reinas en las dos experiencias ocurrió en la primera etapa, entre la introducción de las reinas a las cajas de inicio y el comienzo de la oviposición. Una vez iniciada la postura de huevos la pérdida de reinas disminuyó en forma marcada, verificando en la última etapa menos del 7 % del total de las reinas muertas.

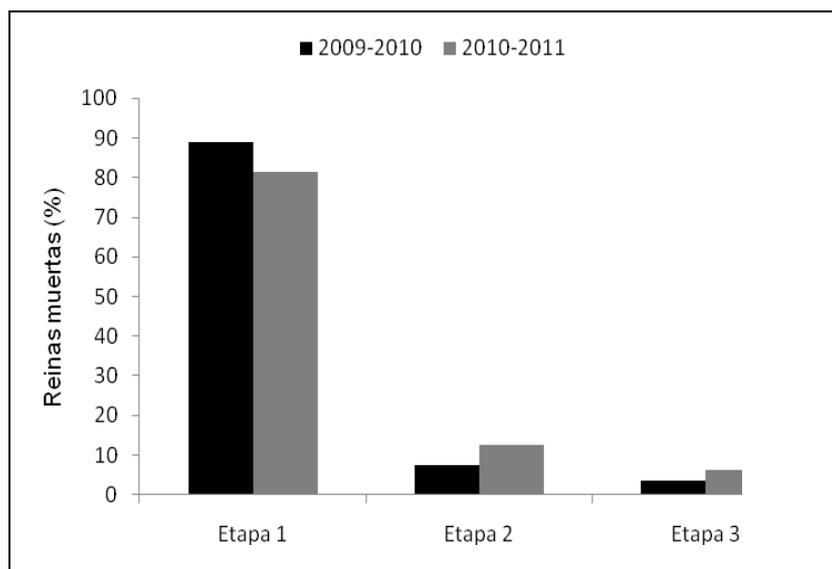


Figura 22. Distribución de las reinas muertas entre las tres etapas de la cría. Etapa 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición. Etapa 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera. Etapa 3: desde el nacimiento de la primera obrera a la finalización de las actividades de cría.

La duración de las etapas 1 y 2 se determinó analizando conjuntamente los registros de las dos experiencias. Tanto en *B. atratus* como en *B. bellicosus* la duración de las dos etapas mostró una gran variabilidad (Figura 23). Las reinas de *B. atratus* iniciaron antes la oviposición que las reinas de *B. bellicosus*, mientras que la duración del ciclo de cría de *B. atratus* fue en promedio casi 7 días más largo que el de *B. bellicosus* (Figura 23).

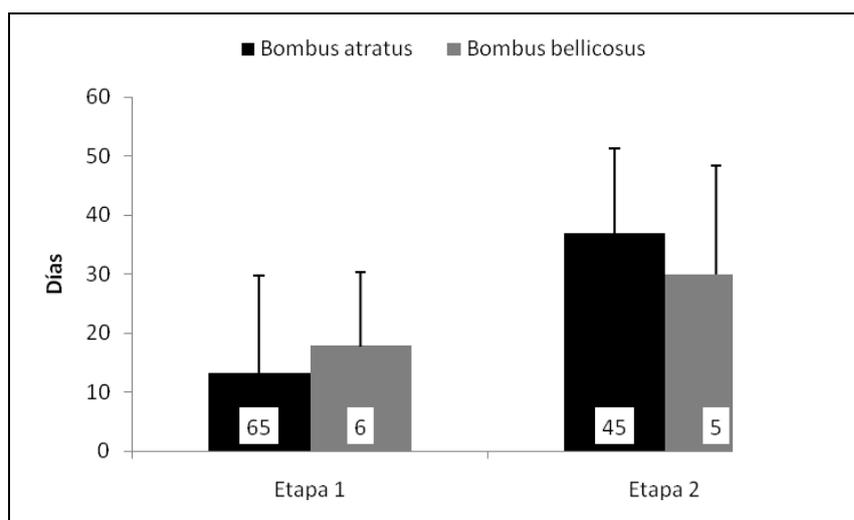


Figura 23. Duración de las etapas 1 y 2 de la cría para *B. atratus* y *B. bellicosus*. Etapa 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición. Etapa 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera.

#### 4. DISCUSIÓN

##### 4.1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD POLINIZADORA

###### 4.1.1. Tamaño y ritmo de actividad de las colonias de abejorros

El tamaño de las colonias de abejorros trasladadas al semillero fue muy variable, sin superar en ningún caso los 150 individuos. La población de estas colonias estuvo determinada por su tamaño al momento de ser extraídas de la ubicación original y por las pérdidas durante el proceso de trasiego, donde inevitablemente se dañan y mueren obreras de manera accidental y se dejan pecoreadoras en el campo. También como causa del el traslado pueden perderse pecoreadoras que no se orientan en el nuevo emplazamiento y no consiguen regresar a su nido. Tanto *B. atratus* como, *B. bellicosus* al pertenecer al género *Bombus*, pueden contar con hasta 400 individuos (Goulson 2003a). La pérdida de obreras experimentada en los primeros días luego de instaladas las colonias en el semillero (25 % aproximadamente) es un factor a tener en cuenta al momento de

recomendar un número óptimo de abejorros por hectárea que deberían ser llevados al cultivo para que la polinización sea efectiva.

A lo largo del período de estudio el tamaño de las colonias presentó variaciones que pueden explicarse por la tasa de nacimientos y muertes de obreras. De todos modos, considerando globalmente la población de todas las colonias, no hubo variaciones importantes en el número de abejorros, ni en la proporción entre *B. atratus* y *B. bellicosus*. Esto hace suponer que la deriva de pecoreadoras entre los distintos nidos fue importante. La deriva es un fenómeno muy común en las abejas melíferas cuando las colmenas se encuentran cercanas como es el caso de los apiarios de producción (Gary 1992).

El registro de abejorros entrando y saliendo de las colonias en tres momentos del día no mostró un patrón consistente, existiendo variaciones en el ritmo de actividad entre los diferentes momentos del día, así como en diferentes fechas. Estos resultados no coinciden con los hallados por Salvarrey (2009) quien encontró que el ritmo de actividad de una colonia de *B. atratus* y una de *B. bellicosus* se mantuvo bastante constante entre las 9.00 y las 18.00 hs durante un día del mes de marzo. Las variaciones observadas en la actividad de los abejorros pudieron estar relacionadas con cambios en las condiciones ambientales. En este sentido, se registró una asociación moderada entre el ritmo de actividad de los abejorros y la temperatura del ambiente. También fue llamativo que la mayor actividad de los abejorros registrada el 22 de marzo haya coincidido el día más húmedo del período de estudio. La humedad puede tener un efecto indirecto en el aumento de la actividad de los abejorros, a través de su efecto sobre las plantas. Shuel (1992) señala que el aumento de la humedad ambiente no favorece la concentración del néctar y las flores pueden ofrecer un volumen mayor de néctar pero menos concentrado. Si este fenómeno ocurrió en el trébol rojo, los abejorros quizás redujeron la duración de sus viajes de pecoreo al obtener una buena carga de néctar visitando menos flores, aumentando en consecuencia el ritmo de entradas y salidas del nido.

#### **4.1.2. Presencia de los abejorros en el semillero**

El análisis de los abejorros registrados en las transectas y en las parcelas (medias ajustadas con las variables distancia y horario), no mostró un gradiente en la distribución de los insectos desde las cajas-nidos al extremo opuesto del semillero como se esperaba. Sobre este aspecto Varela y Rebuffo (1999) encontraron que la producción de semillas de trébol rojo disminuía al aumentar la distancia a los nidos de abejorros, lo que sugiere la existencia de un gradiente de distribución de los insectos. En las condiciones en que se realizó el presente estudio no se puede descartar la existencia de tal gradiente en la distribución de los abejorros de las colonias experimentales, ya probablemente estaba enmascarado por la presencia de un gran número de abejorros provenientes de nidos “naturales” cercanos al semillero (ver más adelante).

Los registros de abejorros realizados en las transectas indican que aunque no hubo un gradiente de distribución de un extremo al otro, los abejorros no se distribuyeron de manera homogénea en el semillero. Esa distribución estuvo determinada por la variación en la densidad de inflorescencias en distintas zonas del semillero.

La mayor concentración de abejorros *B. atratus* sobre el semillero se observó entre las 13.00 y 16.00 hs., pero los individuos que cargaban polen fueron más abundantes durante la mañana. Por otro lado, la densidad de *B. bellicosus* fue bastante constante a lo largo del día. La elección de recursos a explotar en diferentes momentos del día está fuertemente determinada por el aporte de néctar y polen de las diversas especies botánicas disponibles en el radio de vuelo de los abejorros (Goulson, 2003a, 2003b). Estudiando este aspecto, Salvarrey (2009) encontró en un estudio realizado en INIA-LE que los abejorros *B. atratus* visitaban las solanáceas en mayor proporción durante la mañana para recoger polen. En este estudio se verificó que una parte importante del polen que ingresa a los nidos provenía de ese recurso floral, el cual se encontraban en el entorno del semillero. La presencia de flora competitiva es un aspecto

fundamental que condiciona la eficacia en la polinización entomófila de un cultivo (Corbella *et al.* 1995, Peterson *et al.* 1960). En este estudio se observó claramente que los abejorros, además del trébol rojo, visitaron otros recursos fundamentalmente para coleccionar polen.

Los registros de abejorros sobre el semillero mostraron un incremento sostenido muy marcado del número de insectos a lo largo del período de estudio. La presencia de abejorros en el semillero era esperable, ya que *B. atratus* y *B. bellicosus* son muy comunes en Uruguay (aunque no se ha observado a *B. bellicosus* en el norte del país) y presentan preferencias por el trébol rojo sobre otros recursos (Arbulo *et al.* 2011a). Adicionalmente, estudios previos indican que en general la población de ambas especies es muy abundante durante el mes de marzo en INIA-LE (Arbulo *et al.* 2011a, Salvarrey 2009).

#### **4.1.3. Otros insectos presentes en el semillero**

Además de los abejorros sobre las inflorescencias de trébol rojo se observaron pecoreando lepidópteros, dípteros y otros himenópteros. Llama la atención la importante presencia de mariposas de la familia Pieridae, especialmente *Colias lesbia*, en la primera mitad del período de estudio. Esto pudo deberse a que comúnmente los adultos aparecen de forma explosiva en determinados momentos en cultivos de leguminosas forrajeras, plantas de las cuales se alimentan las larvas (Bentancourt y Scatoni 2006). Los lepidópteros no constituyen un grupo de insectos que se destaquen por su capacidad polinizadora ya que, a diferencia de las abejas (Superfamilia Apoidea) no cuentan con estructuras especializadas para el transporte de polen (por ej. pelos) y, y sólo coleccionan néctar para su propia alimentación por lo que no suelen visitar un número importante de flores consecutivas. Por lo tanto, aunque su presencia fue muy importante, las mariposas seguramente no contribuyeron de forma significativa a la polinización del trébol rojo. Para Free (1965), hay pocos insectos, aparte de las abejas melíferas y los abejorros, que puedan polinizar de forma eficiente el trébol rojo.

Llamativamente, las abejas melíferas fueron observadas en muy baja frecuencia en el semillero pese a que a 700 m se encontraba un apiario de 25 colmenas y a que no había ningún cultivo importante de especies de valor apícola en las inmediaciones. La ausencia de abejas puede explicarse por la dificultad que tienen para acceder al néctar del trébol rojo debido a la profundidad de la corola (Corbella *et al.* 1995, McGregor 1976).

#### **4.1.4. Origen botánico del néctar y el polen colectados por los abejorros y las abejas melíferas**

El análisis palinológico del polen corbicular de los abejorros mostró que éstos fueron disminuyendo la colecta de polen en el trébol rojo a lo largo del período de estudio, con excepción del último registro donde el incremento fue notorio. Este comportamiento es llamativo porque la disminución en la utilización del trébol rojo como recurso polinífero coincide con el incremento de inflorescencias receptivas en la pradera. Posiblemente la disponibilidad de otros recursos más rentables explique la tendencia encontrada. En este sentido, el polen de solanáceas estuvo muy representado en las muestras coincidiendo con los resultados reportados por Salvarrey (2009) para una colonia de *B. atratus*.

En las abejas melíferas menos del 50 % del polen colectado provenía del trébol rojo, estando un poco más representado en el último registro. Estos resultados concuerdan con la poca presencia de abejas melíferas observada en la pradera. Palacio (1987) en un estudio de polinización de trébol rojo con abejas melíferas encontró que las abejas colectaban poco polen de esta leguminosa, con un máximo de 45 %. En un estudio similar, Corbella *et al.* (1995) halló que alrededor del 30 % del polen corbicular correspondía al trébol rojo. Para Holm (1966) las abejas melíferas no colectan polen de trébol rojo porque no les resulta atractivo.

El hecho de que tanto los abejorros como las abejas melíferas incrementaran la colecta de polen de trébol rojo al final del período de estudio pudo deberse a una reducción de la oferta floral en las inmediaciones de la pradera. Teniendo en cuenta que la producción de polen (y de néctar) puede variar a lo largo del período

de floración de una especie vegetal (Heinrich 2004, Goulson 2003a), no se puede descartar que se haya debido a que el trébol rojo ofreció mayor cantidad de polen al final del período de estudio.

El análisis palinológico de las muestras de polen y néctar extraídas de los pots mostró claramente que los abejorros utilizan el trébol rojo más como un recurso nectarífero (prácticamente el único polen encontrado) que polinífero. Los abejorros, a diferencia de las abejas melíferas, cuentan con una probóscide suficientemente larga para alcanzar sin problemas el néctar del trébol rojo (Heinrich 2004, Goulson 2003b, Michener 1974). En *B. atratus* y *B. bellicosus*, Arbulo *et al.* (2011a) determinaron que el largo de las probóscides es de 8,42 y 7,88 mm, respectivamente, superando los 7 mm necesarios para acceder al néctar de las flores de trébol rojo (Holm 1966). A pesar de que suelen considerarse mejores polinizadores aquellos individuos que cargan polen (Free 1965), en el caso del trébol rojo los recolectores de néctar podrían ser igual de eficientes. Cuando un abejorro introduce la probóscide para recolectar néctar, la forma de la flor del trébol rojo hace que la región ventral de la probóscide quede cargada de granos de polen que pueden efectivamente polinizar otras flores en las subsiguientes visitas (Plowright y Hartling 1981).

Una recomendación técnica para aumentar el número de abejorros en el trébol rojo es la eliminación de la flora competitiva en las inmediaciones del semillero, al menos las que están al alcance del productor. Los análisis palinológicos realizados al néctar y al polen colectados por los abejorros indican que las solanáceas y las papilionoideas (otras especies diferentes al trébol rojo) son las especies botánicas que competieron con el trébol rojo en atraer a los insectos.

#### **4.1.5. Velocidad de pecoreo de *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera***

Los seguimientos individuales de las dos especies de abejorros y de las abejas melíferas mostraron diferencias en el comportamiento de pecoreo. El análisis de todos los registros realizados (medias ponderadas) mostro que las tres especies visitan el mismo número de inflorescencias por unidad de tiempo, pero

los abejorros visitan casi tres veces más flores que las abejas melíferas. Esta diferencia entre los abejorros y las abejas melíferas puede explicarse por la mayor longitud de la probóscide de los primeros que les permiten extraer el néctar de las flores de trébol rojo a mayor velocidad (Holm 1966).

El análisis específico del número de flores de cada inflorescencias que visitaban las dos especies de abejorros y las abejas melíferas, mostró que *B. atratus* fue la especie que visitó mayor cantidad de flores por inflorescencias, seguida de *B. bellicosus* y las abejas melíferas. Este resultado también puede ser explicado por la relación entre el largo de la probóscide y la velocidad de pecoreo ya que la probóscide de *B. atratus* es mayor que la de *B. bellicosus*, y a su vez la de esta especie es mayor que la de las abejas melíferas. Por otro lado, la especie *B. bellicosus* fue la que visitó mayor cantidad de inflorescencias. Estos resultados tienen implicancia al momento de evaluar la capacidad polinizadora de cada especie. Teniendo en cuenta que trébol rojo es una especie auto estéril un buen insecto polinizador debería visitar un gran número de inflorescencias durante sus vuelos de pecoreo. En ese sentido, *B. bellicosus* sería la especie que mejor contribuiría a la polinización del cultivo pues favorecería el traslado de polen entre plantas diferentes. Sin embargo, *B. atratus* al visitar un mayor número de flores totales y flores por inflorescencia por unidad de tiempo estaría polinizando una mayor cantidad de flores. Adicionalmente, Plowright y Hartling (1981) demostraron que aunque un abejorro visite un número elevado de flores en una misma inflorescencia (80 por ejemplo), lo que en principio podría suponer un problema ya que se acumularía polen incompatible, el porcentaje de semillas que se producen en esa inflorescencia puede ser superior al 50 %. Estos resultados sugieren que *B. atratus* se desempeñaría mejor como polinizador del trébol rojo que *B. bellicosus*.

La variabilidad en el número de flores visitadas por inflorescencia observada en los abejorros refleja la flexibilidad de estos insectos de responder a cambios en la rentabilidad del recurso. De acuerdo con Plowright y Hartling (1981), cuando las flores ofrecen una buena recompensa los abejorros tienden a visitar mayor número de flores por inflorescencia y cuando el nivel de néctar es bajo suelen abandonar la inflorescencia luego de visitar una o unas pocas flores.

Las diferencias entre el comportamiento pecoreador de los abejorros con respecto a las abejas melíferas se vio reflejado en el elevado rendimiento de proporción de semillas por inflorescencias obtenidas tanto en parcelas como en la carpa que contenía una colonia de abejorros.

#### **4.1.6. Rendimiento de semillas**

##### **4.1.6.1. En las parcelas experimentales**

En general el análisis de rendimiento en la producción de semillas de trébol rojo se realiza a partir de cultivos en primera floración (Peterson *et al.* 1960). Este estudio se llevó a cabo en un semillero que se encontraba en su segunda floración, lo que podría explicar en parte por qué algunos valores de rendimiento difirieron de los reportados en la literatura. Esto fue particularmente importante en aquellos indicadores que dependen del estado de la planta y de las condiciones ambientales en las que se desarrolló, como son: el número de inflorescencias por metro cuadrado, el número de flores por inflorescencias, el porcentaje de materia seca y el peso de mil semillas (Formoso 2010). El indicador que se mostró más bajo en relación a lo citado en la bibliografía consultada fue el número de inflorescencias por metro cuadrado que correspondió a 296,72, cuando el reportado por Formoso (2010) para una primera floración de trébol rojo es de 700 inflorescencias por metro cuadrado. Por otro lado, el número de flores por inflorescencias presentó una media de 106,89, siendo mayor al máximo experimental reportado para Uruguay que es de 83,2 (Formoso 2010). El peso de mil semillas obtenido (1,75 g) fue similar al reportado por Formoso (2010) como valor máximo experimental (1,80 g). Sin embargo, este resultado posiblemente sea producto del método de análisis de las semillas usado en el presente trabajo, el cual siguió el procedimiento comercial que tiende a seleccionar las semillas más pesadas. Debido a esto, el peso de mil semillas obtenido posiblemente esté sobre-valorado.

En relación a los cuatro indicadores mencionados previamente, el número de abejorros presentes en la pradera se relacionó significativamente sólo con el número de inflorescencias por metro cuadrado y con el porcentaje de materia seca.

Esto refleja cómo la disponibilidad de recursos estuvo determinando la presencia de abejorros en las parcelas.

Por otro lado, los indicadores de rendimiento que resultan de la acción de los polinizadores, como son: la proporción de semillas por inflorescencia, el número de inflorescencias maduras por metro cuadrado y el peso de semillas por metro cuadrado, son los que revisten mayor importancia a la hora de evaluar la capacidad polinizadora de los abejorros en el trébol rojo. La proporción de semillas por inflorescencia promedio fue de 68,9 %. Este valor es superior al reportado por Formoso (2010), quien determinó que el máximo rendimiento de cuajado podría alcanzar a 61,9 % utilizando abejas melíferas como polinizadores. Sin embargo, a diferencia de lo que podría esperarse, este indicador no se vio afectado por el número de abejorros presentes en las parcelas. Probablemente la explicación de esto radique en la forma en que se distribuyeron los abejorros sobre el cultivo. La heterogeneidad del semillero en cuanto a la distribución de inflorescencias, hace que este pueda considerarse como un conjunto de parches de distintos tamaños. Para optimizar la obtención de recursos, los abejorros suelen ir ocupando parches en función del tamaño y del grado de ocupación de los mismos (Heinrich 2004, Goulson 2003a). Los resultados obtenidos en el semillero podrían corresponder a comportamientos de este tipo, en donde los abejorros eligieron pecorear en las zonas con una mayor concentración de inflorescencias hasta alcanzar un momento en el cual la densidad de individuos los fue llevando a pecorear en regiones con menor número de inflorescencias. El resultado final de este comportamiento es la distribución uniforme de abejorros sobre la pradera en relación a la distribución de recursos: mayor número de abejorros en sitios con mayor número de inflorescencias y viceversa. Esto se ve reflejado en la relación encontrada entre número de abejorros y número de inflorescencias atractivas (Figura 13).

Por otro lado, el número de inflorescencias maduras por metro cuadrado también se mostró relacionado positivamente con el número de abejorros, lo que refleja su acción como polinizadores. Como el número de abejorros estuvo asociado al total de inflorescencias por metro cuadrado y el número de inflorescencias maduras es una proporción de ese total, se podría concluir que la

cantidad de flores polinizadas no depende de la densidad absoluta de los abejorros si no de la mera presencia de los mismos que va a estar determinada por el número de inflorescencias atractivas disponibles.

Teniendo en cuenta que el número de inflorescencias maduras (con semillas) se asocia al número de abejorros y que el porcentaje de semillas por inflorescencia obtenido fue elevado, es probable que la relación encontrada entre el peso de las semillas por metro cuadrado y el número de abejorros refleje un mayor número de semillas producidas por unidad de superficie. No se puede descartar que el peso individual de las semillas también sea mayor, pero debido a las limitantes del método utilizado que selecciona las semillas más pesadas, no es posible establecer una comparación con datos bibliográficos. Cualquiera sea el caso, la relación obtenida de la regresión, que establece que por cada dos abejorros el peso de semillas medido en gramos por metro cuadrado incrementó en una unidad, es información valorable a tener en cuenta a la hora de implementar a los abejorros como polinizadores en la producción comercial de semillas de trébol rojo.

Todo esto indicaría que lo importante para que se obtenga un buen rendimiento de semillas no sería la densidad absoluta de abejorros si no la relación entre el número de abejorros y el número de inflorescencias en el cultivo. De este modo, el factor que habría limitado el rendimiento de semillas en el presente estudio sería el número de inflorescencias por unidad de superficie, que como se mencionó previamente fue notoriamente menor que lo registrado en condiciones normales. En concordancia con esto, Varela y Rebuffo (1999) en otro estudio de polinización de trébol rojo con abejorros, encontraron que el rendimiento de semillas estaba asociado a la mayor densidad de inflorescencias.

A partir de los indicadores de rendimiento obtenidos en las parcelas se puede determinar que bajo las condiciones en las que se realizó este trabajo, el rendimiento promedio por hectárea del semillero fue de 74 kg. Este valor está muy por debajo del promedio nacional. No obstante, si el rendimiento por hectárea se calcula utilizando los valores de los indicadores obtenidos en el presente trabajo pero con un número de inflorescencias de 700 por metro cuadrado (correspondiente a una primera floración de trébol rojo), se obtendría un

rendimiento de 174,57 kg/ha. Este valor hipotético correspondería a un 50 % más del valor promedio nacional de producción de semillas de trébol rojo, que es de 119 kg/ha (García *et al.* 1991).

Para finalizar, vale mencionar que por causas ajenas al proyecto el estudio debió ser terminado abruptamente el día 12 de abril. En ese momento la abundancia de abejorros era considerablemente alta y las inflorescencias maduras representaban aproximadamente el 74 % del total, por lo que aún restaban inflorescencias atractivas que podían ser polinizadas. De acuerdo al comportamiento de los abejorros a lo largo del período de estudio, que respondieron a la disponibilidad de inflorescencias atractivas, es de esperar que el número de inflorescencias maduras hubiera alcanzado el 100 % si la trilla se hubiese postergado, probablemente, los valores de rendimiento hubiesen sido superiores. Por todo esto, el resultado más ajustado a la acción de los polinizadores es la proporción de semillas por inflorescencia.

#### **4.1.6.2. En las carpas**

Los resultados obtenidos en las carpas muestran como los abejorros superan a las abejas melíferas en la polinización de trébol rojo, aun cuando éstas poseen colonias con mayor cantidad de individuos. Si bien las diferencias observadas entre tratamientos para los diferentes indicadores obtenidos no contaron con respaldo estadístico, en la Figura 20 se observa claramente una tendencia a favor de los abejorros. Incluso uno de los indicadores de rendimiento, el peso de semillas por metro cuadrado, fue tan superior en la carpa polinizada por abejorros que la diferencia sí dio significativa. La falta de respaldo estadístico probablemente se debió al bajo número de carpas por tratamiento. La desigualdad en el número de repeticiones en cada tratamiento se debió a la dificultad de contar con más de un nido de abejorros en el momento de instalación de las carpas, ya que se le dio prioridad a la colocación de nidos a cielo abierto en el semillero (propuesta original del proyecto). Adicionalmente, las inclemencias del tiempo resultaron en la ruptura de dos carpas lo que llevo a descartarlas del estudio (una control y otra con un núcleo de abejas melíferas). Otro factor que pudo interferir

en la constatación de diferencias entre los tratamientos fue la calidad de las parcelas cubiertas por carpas. El estado del trébol rojo en cuanto al número de inflorescencias y número de flores por inflorescencias difirió mucho entre las parcelas cubiertas y esas diferencias influyeron en los valores de rendimiento obtenidos para cada carpa y por tanto para cada tratamiento.

Dada la biología reproductiva del trébol rojo, en las carpas con ausencia de polinizadores se esperaría obtener valores nulos de rendimiento. Sin embargo, se obtuvo un porcentaje de semillas por inflorescencias de 19,34 % y un valor de peso de semillas de 2,37 g/m<sup>2</sup>. Estos resultados sugieren la presencia de algún polinizador que no fue observado, pudiendo haber entrado por una perforación del tejido o tratarse de insectos que quedaron atrapados durante la colocación de las carpas. Estudios similares frente a este tipo de resultados reportaron la presencia de pequeños coleópteros los cuales contribuyeron a la polinización de trébol rojo (Rao *et al.* 2007). Así mismo, el peso de mil semillas obtenido a partir del tratamiento control que correspondió a 2,16 g, fue muy alto. No obstante, al igual que ocurrió en las parcelas a cielo abierto, este resultado probablemente esté sobre-valorado debido al método utilizado para el análisis de semillas.

A pesar de estas dificultades metodológicas, cabe destacar que el rendimiento obtenido en la carpa polinizada con abejorros correspondería a 198 kg/ha, lo que estaría superando lo obtenido en las parcelas a cielo abierto. Adicionalmente, la proporción de semillas por inflorescencias obtenida en la carpa con abejorros (77,43%) también fue mayor que el obtenido en las parcelas, coincidiendo con resultados obtenidos en estudios similares utilizando como polinizadores otras especies de abejorros de Norteamérica (Rao *et al.* 2007). Estos dos resultados reafirman el potencial de los abejorros nativos como polinizadores del trébol rojo, en este caso en un escenario donde se vieron obligados a explotar al máximo el único recurso disponible. En las mismas condiciones, utilizando como polinizadores a las abejas melíferas, se obtuvieron valores de rendimiento mucho más bajos (59,3 kg/ha para peso de semillas por superficie; 32,82 % semillas por inflorescencias).

## 4.2. CRÍA ARTIFICIAL DE ABEJORROS NATIVOS

La cría artificial de abejorros se practica con éxito a escala comercial desde la década de 1980 con unas pocas especies euroasiáticas y norteamericanas, siendo *B. terrestris* la más utilizada (Velthuis y van Doorn 2006). Estas especies, por la forma de alimentar a las larvas, forman parte del grupo de “almacenadores de polen” y se considera que son más fáciles de criar artificialmente que las especies que integran el grupo de “hacedores de bolsillo”, entre las que se encuentran *B. atratus* y *B. bellicosus* (Ptacek y Drobna 2006, Velthuis y van Doorn 2006). Sin embargo, las dos experiencias de cría artificial a pequeña escala realizadas con estas dos especies de abejorros nativos mostraron resultados satisfactorios, consiguiendo formar colonias con el 21,5 y el 30,3 % de las reinas iniciales en la primer y segunda experiencia, respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro del rango de éxito de cría obtenido a partir de reinas capturadas a campo (20 a 50 %) reportado para especies del grupo de “almacenadores de polen” (Evans *et al.* 2007). Así mismo, en la región hay experiencias exitosas de cría de especies nativas, como es el caso de *B. atratus* en Brasil (Garófalo 1979) y Colombia (Cruz *et al.* 2008, Aldana *et al.* 2007), y *B. dalhbomii* en Chile (Estay 2007). En Uruguay Varela y Rebuffo (1999) consiguieron criar con éxito a *B. bellicosus*, logrando que un 13 % de las reinas formaran colonias.

La muerte de las reinas, especialmente en los días siguientes a introducirlas en las cajas de inicio, es el principal problema encontrado en las dos experiencias de cría. Los abejorros son hospederos de una gran variedad de parásitos como virus, bacterias, hongos, protozoos, nematodos, himenópteros y dípteros parasitoides y ácaros (Schmid-Hempel 2001). Es posible que en la situación de confinamiento en que se encuentran las reinas, sin poder realizar vuelos y defecando dentro de la caja, aumente la incidencia de diferentes patógenos y parásitos deteriorando su condición sanitaria. En este estudio frecuentemente se observaron ácaros sobre el cuerpo de las reinas. Los abejorros pueden albergar un número importante de ácaros que se transmiten verticalmente a través de la reina (Maggi *et al.* 2011). Recientemente se ha encontrado en diferentes poblaciones de *B. atratus* y *B. bellicosus* de Uruguay una alta prevalencia del microsporidio

*Nosema ceranae* (Arbulo *et al.* 2011b). Este microsporidio se encuentra infectando a las abejas melíferas en todos los continentes (Aurori *et al.* 2011, Fries 2010, Klee *et al.* 2007) y podría estar afectando también a las poblaciones de abejorros. En este estudio se determinaron dos parámetros relevantes de la biología reproductiva de *B. atratus* y *B. bellicosus*, como son el tiempo transcurrido entre el confinamiento de las reinas y el inicio de la oviposición, y entre la oviposición y el nacimiento de la primer obrera, que son importantes tener en cuenta en la cría artificial de abejorros. Ambos registros mostraron una alta variabilidad, pese a que las reinas se encontraban en condiciones controladas y uniformes. Es posible que el tiempo transcurrido entre la introducción de las reinas a las cajas de inicio y la construcción del nido, no sea representativo del que se da naturalmente como consecuencia de las condiciones completamente distintas en las que se encuentran las reinas. Sin embargo, el tiempo entre la oviposición y el nacimiento de la primera obrera podría ser similar al encontrado en la naturaleza. La duración de este ciclo de desarrollo varía dependiendo de la especie, de la temperatura y de la cantidad y calidad del alimento (Heinrich 2004). En este estudio se determinó que, bajo las condiciones de cautiverio utilizadas, la duración promedio del ciclo de cría de *B. atratus* es de 36,8 días y la de *B. bellicosus* es de 30 días. No se cuenta con datos de la duración del ciclo en condiciones naturales para ninguna de estas especies. Por otro lado, en condiciones de cautiverio similares a las de este estudio, en Colombia la duración del ciclo de cría de *B. atratus* varía entre 24 días (Cruz *et al.* 2008) y de 33 días (Torres y Gómez 2009). La menor duración obtenida en estos trabajos podría deberse a que las poblaciones de *B. atratus* en Colombia tienen un ciclo más corto por estar adaptadas a un clima tropical. Otro factor que puede influir en esas diferencias, es la calidad del alimento que se le proporcionó a las larvas. Aunque en todos los casos fue una pasta de polen corbicular de abejas melíferas, este puede ser de orígenes botánicos muy diferentes y por tanto su calidad puede variar considerablemente (Roulston y Cane 2000). Este es un aspecto esencial a tener en cuenta en futuras experiencias de cría ya que la calidad del alimento no sólo puede afectar la duración del ciclo si no también el tamaño y número de las obreras producidas y por tanto el desarrollo de la colonia.

El tiempo transcurrido entre el encierro de la reina en la caja de inicio y el nacimiento de la primera obrera, es de aproximadamente 50 días para ambas especies. Esta información es relevante para planificar la cría artificial de abejorros con vistas a obtener colonias en períodos definidos, por ejemplo para polinizar cultivos específicos. En futuros estudios se deben determinar las curvas de crecimiento poblacional para conocer el tiempo completo que insume obtener una colonia en condiciones adecuadas para ser trasladada al campo. De todos modos, teniendo en cuenta que las reinas empiezan a salir de la hibernación a comienzos de primavera, con los tiempos de cría mencionados anteriormente, no parece posible obtener colonias pobladas (por ejemplo con 50 obreras) antes de 90 días de la captura de las reinas. Así, la posibilidad de conseguir artificialmente colonias de abejorros para polinizar el trébol rojo durante la primera floración (diciembre-enero) y alcanzar así mayores rendimientos de semillas (ver Capítulo 1), no sería factible si se parte de reinas capturadas en primavera. Esta dificultad se puede superar si la cría se inicia a partir de reinas fecundadas e hibernadas en el laboratorio durante el otoño. Esta técnica es usada ampliamente en la cría de abejorros para fines comerciales o de investigación ya que permite contar con colonias a lo largo del año (Yoon *et al.* 2010a, 2010b, Evans *et al.* 2007, Velthuis y van Doorn 2006) y sería necesario adaptarla para la cría de *B. atratus* y *B. bellicosus*.

En las experiencias de cría realizadas, las colonias que contaban con más de 10 obreras se trasladaron al campo y no recibieron más alimento. En estas condiciones se observó que el crecimiento poblacional se detenía y las colonias no conseguían sobrevivir demasiado tiempo. Es necesario realizar nuevos estudios para mejorar el éxito del traslado de las colonias del laboratorio al campo. En este sentido, es posible que el problema se deba únicamente al pequeño tamaño de las colonias al momento de sacarlas del laboratorio.

En suma, este estudio muestra que es factible la cría artificial de las dos especies de abejorros nativos del Uruguay, *B. atratus* y *B. bellicosus*, generando la posibilidad de manejar las colonias para polinizar eficientemente diferentes cultivos.

## 5. CONSIDERACIONES FINALES

El trébol rojo (*Trifolium pratense*) es una leguminosa forrajera difícil de polinizar por las abejas melíferas y otros insectos. Esta dificultad puede explicarse por la profundidad de su corola, lo que limita el acceso al néctar haciendo que el recurso sea poco rentable y, por ende, no sea visitado por muchos insectos. Los problemas de polinización del trébol rojo tienen como consecuencia que, si no están presentes los polinizadores adecuados, los rendimientos de semillas suelen ser muy bajos, bastante por debajo del potencial biológico de la especie. Uruguay no escapa a esta situación teniendo históricamente rendimientos de semillas muy bajos.

Los resultados hallados en esta tesis muestran la factibilidad de obtener buenos rendimientos de semillas de trébol rojo utilizando como polinizadores a los abejorros nativos *B. atratus* y *B. bellicosus*. Dos aspectos importantes pueden explicar la buena capacidad polinizadora de los abejorros en el trébol rojo. Por un lado, ambas especies utilizaron el trébol rojo casi como su único recurso nectarífero y como una de sus principales fuentes de polen, lo que indica la alta preferencia de los abejorros por explotar esta leguminosa. En cambio, las abejas melíferas, el insecto polinizador más utilizado en el mundo, explotaron el trébol rojo como un recurso secundario, como se verificó analizando el polen corbicular. Esto explicaría la escasa presencia de abejas en el semillero pese a tener un apiario cercano de 25 colmenas.

Por otro lado, un estudio comparativo sobre la velocidad de pecoreo entre *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera* mostró que los abejorros visitan casi tres veces más flores por unidad de tiempo que las abejas melíferas, lo que seguramente se traduce en una mayor capacidad polinizadora de los primeros.

Los dos aspectos mencionados se suman a otras características del género *Bombus* ya conocidas que los destacan como excelentes polinizadores: gran tamaño corporal, probóscide larga, capacidad de pecorear en condiciones ambientales poco favorables, horario de actividad extenso y capacidad de obtener polen por “zumbido”.

El rendimiento de semillas de trébol rojo encontrado en este estudio fue muy bueno. El mejor indicador de rendimiento, por depender de la polinización del cultivo, fue la proporción de semillas por inflorescencia que alcanzó el 68,9 % en las parcelas y el 77,3% en la carpa conteniendo una colonia de abejorros. Al tratarse de la segunda floración del semillero, con una densidad de inflorescencias bastante menor que el que se presenta en la primera floración, el rendimiento por superficie no fue destacado. En este punto se encuentra una limitante importante al momento de querer polinizar un semillero de trébol rojo con abejorros: el ciclo biológico de los abejorros determina que recién en marzo las colonias alcancen su mayor tamaño, por lo que resulta imposible polinizar un semillero de trébol rojo en su primera floración (diciembre-enero), cuando el potencial de producción de semillas es mayor.

La obtención de suficientes colonias de abejorros en el período en que se quiere polinizar un cultivo es una limitante tecnológica que dificulta la utilización de estos polinizadores.

La experiencia de cría artificial de abejorros nativos realizada a pequeña escala abre la posibilidad de realizar una transferencia tecnológica que permita un emprendimiento de cría a mayor escala. Un desarrollo biotecnológico de estas características permitiría disponer de un polinizador nativo eficiente, evitando la introducción de especies exóticas con los riesgos que ello acarrea.

## 6. CONCLUSIONES

El ritmo de actividad de los abejorros no mostró un patrón definido. Se halló una asociación moderada de la actividad con la temperatura ambiente y el día de mayor actividad coincidió con el mayor registro de humedad relativa.

Los abejorros no se distribuyeron en el semillero de trébol rojo siguiendo un gradiente desde la ubicación de los nidos. En cambio, el número de abejorros se asoció positivamente con el número de inflorescencias atractivas.

Además de los abejorros, se constató una fuerte presencia de lepidópteros, especialmente *Colias lesbia* y en menor medida otros himenópteros (fundamentalmente *Xylocopa* sp.) y abejas melíferas.

Los abejorros explotaron el trébol rojo fundamentalmente como recurso nectarífero y como una de sus principales fuentes de polen, lo que indica la alta preferencia de los abejorros por explotar esta leguminosa.

Ambas especies de abejorros mostraron una mayor velocidad de pecoreo que las abejas melíferas. *B. atratus* visita mayor cantidad de flores y de flores por inflorescencias por unidad de tiempo mostrando una mayor capacidad polinizadora que *B. bellicosus*.

Utilizando los abejorros como polinizadores se obtuvieron buenos indicadores de rendimiento de semillas destacándose la proporción de semillas por inflorescencias.

Se identificó como factor limitante para la obtención de un mayor rendimiento de semillas al número de inflorescencias atractivas por unidad de superficie.

Los resultados obtenidos en las experiencias de cría artificial de *B. atratus* y *B. bellicosus* fueron alentadores y muestran la factibilidad de desarrollar esta tecnología con éxito.

La disponibilidad de colonias de abejorros para polinizar el trébol rojo puede contribuir a superar los bajos rendimientos históricos de producción de semillas en Uruguay.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamovich AH, Díaz NB, Morrone JJ. 2004. Distributional patterns of the neotropical and andean species of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 20(1): 99-117.
- Abrahamovich AH, Díaz NB. 2002. Bumble bees of the Neotropical region (Hymenoptera: Apidae). *Biota Colombiana*, 3(2): 199-214.
- Aldana J, Cure JR, Almanza MT, Vecil D, Rodríguez D. 2007. Efecto de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) sobre la productividad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25 (1): 62-72.
- Amin MR, Kwan YJ. 2011a. Time and age specific mating success of bumblebee (*bombus terrestris* L.) reared at different photoperiodic regimes. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 36(1): 13-20.
- Amin MR, Kwan YJ. 2011b. Photoperiod and relationship with body mass and size in bumblebee, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) workers. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 46(4): 447-450.
- Arbulo N, Santos E, Salvarrey S, Invernizzi C. 2011a. Proboscis Length and Resource Utilization in Two Uruguayan Bumblebees: *Bombus atratus* Franklin and *Bombus bellicosus* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology*, 40: 72 - 77.
- Arbulo N, Antúnez K, Santos E, Salvarrey S, Higes M, Invernizzi C. 2011b. Presence of the microsporidium *Nosema ceranae* in *Bombus atratus* and *B. bellicosus*, two Uruguayan native bumblebee species. XXXXII *Apimondia International Apicultural Congress*, Buenos Aires, 2011.
- Aurori CM, Dezmirean DS, Marghitas LA, Moritz RFA. 2011. *Nosema apis* and *N. ceranae* in Western honeybee (*Apis mellifera*) –geographical distribution and current methods of diagnosis. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*. 68: 63-70.

- Beekman M, van Stratum P, Veerman A. 1999. Selection for non-diapause in the bumblebee *Bombus terrestris*, with notes on the effect of inbreeding. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 69-75.
- Beekman M, van Stratum P, Lingeman R. 1998. Diapause survival and post-diapause performance in bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89: 207-214.
- Bentancourt CM, Scatoni IB. 2006. Lepidópteros de importancia económica en Uruguay.
- Bohart GE. 1957. Pollination of alfalfa and red clover. *Annual Review of Entomology*, 2: 355-380.
- Brodie L. 1996. Bumblebee foraging preferences: differences between species and individuals. Tesis para el grado B. Sc. (Hons.) en Ecología en la Universidad de Aberdeen.
- Cameron S.A, Williams PH. 2003. Phylogeny of bumblebees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 28: 552-563.
- Carámbula M. 1981. Producción de semillas de plantas forrajeras. Editorial Hemisferio Sur, 518 p. Montevideo, Uruguay.
- Corbella E, Pierono S, Visca J, Alemán R. 1995. Manejo de colonias de abejas melíferas en la polinización de trébol rojo (*Trifolium pratense*). INIA, Boletín de Divulgación N° 52, 12 p.
- Cruz B, Cure JR, Almanza MT. 2008. Implementación de mejoras para la cría en cautiverio de colonias del abejorro nativo *Bombus pauloensis* (= *B. atratus*) (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Facultad de Ciencias - Universidad Militar Nueva Granada*, 4 (1): 70-83
- Dafni A, Kevan P, Gross CL, Goka K. 2010. *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45(1):101-113.
- de Ruijter A. 1997. Commercial bumblebee rearing and its implications. *Acta Horticulturae*. 437: 261-269.

- Duchateau MJ. 2006. Aspectos biológicos del comportamiento de los abejorros. En: *Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas*, pp: 220-227. Ed.: CIFA La Majonera- La Cañada IFAPA. La Majonera (Almería), España.
- Duchateau MJ. 1985. Analysis of some methods for rearing bumblebees colonies. (Summary). *Apidologie* 16(3): 225-227.
- Estay P. 2007. *Bombus* en Chile: especies, biología y manejo. Colección libros INIA N° 22. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura. Santiago de Chile, Chile.
- Estay P, Wagner A, Escaff M. 2001. Evaluación de *Bombus dahlbomii* (Guér.) como agente polinizador de flores de tomate (*Lycopersicon esculentum* (Mill.)), bajo condiciones de invernadero. *Agricultura Técnica*, Chile, 61(2): 113-119.
- Evans E, Burns I, Spivak M. 2007. *Befriending Bumble Bees. A practical guide raising local bumble bees.* University of Minnesota Extension. Minnesota, USA.
- Formoso F. 2010. Producción de semillas de especies forrajeras. INIA, Serie Técnica N° 190.
- Free JB. 1993. (2ª Ed.). *Insect pollination of crops.* Academic Press. Londres, San Diego.
- Free JB. 1965. The ability of bumble bees and honeybees to pollinate red clover. *Journal of Applied Ecology*, 2: 289 – 294.
- Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 73-79.
- Frison TH. 1927. Experiments in rearing colonies of bumblebees (*Bremidae*) in artificial nests. *Biological Bulletin*. 52: 51-67.
- García JA, Rebuffo M, Formoso F, Astor D. 1991. Producción de semillas forrajeras: Tecnologías en uso. INIA, *Serie Técnica* N° 2, 40 p.
- Garófalo C. 1979. Observações preliminares sobre a fundação solitaria de colonias de *Bombus* (*FervodoBombus*) *atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae). *Boletim de Zoologia*, Universidade Sao Paulo. 4:53-64.

- Gary NE. 1992. Activities and behavior of honey bees. In: The hive and the honey bee. Graham, J.M. (ed.). Dadant & Sons, Hamilton, Illinois.
- Goulson D. 2010. Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America. *Applied Entomology and Zoology*, 45(1): 7-12.
- Goulson D. 2003a. Bumblebees: their behaviour and ecology. *Oxford University Press*, UK.
- Goulson D. 2003b. Conserving wild bees for crop pollination. *Food, Agriculture & Environment*, 1(1), 142-144.
- Gretenkord C, Drescher W. 1997. Successful colony foundation and development of experimentally hibernated *Bombus terrestris* queens depending on different starting methods. *Acta Horticulturae* 437: 271-276.
- Griffin RP, Macfarlane RP, van den Ende HJ. 1991. Rearing and domestication of long tongued bumblebees in New Zealand. *Acta Horticulturae* 288: 149-153.
- Heinrich B. 2004. Bumblebee Economics. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA
- Holm N. 1966. The utilization and management of bumble bees for red clover and alfalfa seed production. *Annual Reviews of Entomology*, 11: 155-186.
- Ings TC, Ward NL, Chittka L. 2006. Can commercially imported bumblebees out-compete their native conspecific. *Journal of Applied Ecology* 43: 940-948.
- Inoue MN, Yokoyama J, Washitani I. 2008. Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.)(Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation* 12: 135-146.
- Izaguirre, P. & Beyhaut, R. 1997. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1 -Papilionoideae (Faboideae). Editorial Hemisferio Sur, 549 pp. Montevideo, Uruguay.

- Izaguirre P, Beyhaut R. 1997. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1 -Papilionoideae (Faboideae). Editorial Hemisferio Sur, 549 pp. Montevideo, Uruguay.
- Jie W, Wenjun P, Jiandong A, Zhanbao G, Yueming T, Jilian L. 2005. Techniques for year-round rearing of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apoidea) in China. *Journal of Apicultural Science* 49(1): 65-69.
- Kearns CA, Thomson JD. 2001. The natural history of bumblebees. A sourcebook for investigations. University Press Colorado. Boulder, Colorado, USA.
- Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tan DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 1-10.
- Kremen C, Williams NM, Thorp W. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *PNAS*, 99(26), 16812-16816.
- Kwon YJ, Than KK, Suh S.J. 2006. New method to stimulate the onset of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) rearing: using worker helpers in the presence of frozen pupae. *Entomological Research* 36: 202-207.
- Kwon YJ, Saeed S, Duchateau MJ. 2003. Stimulation of colony initiation and colony development in *Bombus terrestris* by adding a male pupa: the influence of age and orientation. *Apidologie* 34: 429-437.
- Littell RC, Stroup WW, Freund RJ. 2007. SAS for Lineal Models. Fourth Edition. *SAS Institute Incorporate*, Cary, North Carolina, USA.
- Maggi M, Lucia M, Abrahamovich AH. 2011. Study of the acrofauna of native bumblebee species (*Bombus*) from Argentina. *Apidologie* 42: 280-292.

- Martin EC. 1975. Empleo de las abejas en la polinización de las cosechas, en Dadant (Ed.), La colmena y la abeja melífera, Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, 1975; pp. 741-789.
- Matheson A. 1996. Bumble Bees for pleasure and profit. *International Bee Research Association (IBRA)*. Cardiff, UK.
- Mc Gregor SE. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. *Agricultural Handbook 496*, USDA Washington D.C.
- Michener CD. 1974. The Social behavior of Bees. A comparative study. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- O'Toole C. 2003. Bumblebees. Gardens need bees; bees need homes. Osmia Publications. Rothley, UK.
- Palacio MA. 1987. Estudio de la relación planta polinizador para la producción de semilla de trébol rojo (*Trifolium pratense* L) en el SE de la Provincia de Buenos Aires. Trabajo de graduación. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias. Balcarce, Argentina.
- Peterson AG, Furgala B, Holdaway FG. 1960. Pollination of red clover in Minesota. *Journal of Economic Entomology*, 53: 546-550.
- Plath OE. 1923. Breeding experiments with confined *Bremus (Bombus)* queens. *Biological Bulletin* 45: 325-341.
- Plowright RC, Lavery M. 1984. The ecology and sociobiology of bumblebees. *Annual Review of Entomology*, 29: 175-199.
- Plowright RC, Hartling LK. 1981. Red clover pollination by bumble bees: a study of the dynamics of a plant-pollinator relationship. *Journal of Applied Ecology*, 18: 639 – 647.
- Ptacek V, Drobna J. 2006. Cría y uso de los abejorros para la polinización de los recursos genéticos de legumbres forrajeras. En: Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas, pp: 124-138. Ed.: CIFA La Majonera- La Cañada IFAPA. La Majonera (Almería), España.

- Ptacek V. 1991. Trials to rear bumble bees. *Acta Horticulturae* 288: 144-148.
- Rao S, Stephen WP, Bergh J. 2007. Comparison of red clover pollination by commercial and native bees in seed production fields in the Willamette Valley. In Young, W.C., Ed., *Seed Production Research*, Oregon State University Publication 127: 59-62.
- Röseler PF. 1985. A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (Apidae, Bombini) colonies in captivity. *Apidologie* 16(2): 165-170.
- Roulston T, Cane JH. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. En: Dafni A, Hesse M, Paccini E. (Eds.) *Pollen and pollination*. Viena: Springer. pp. 187-209.
- Ruz L. 2002. Bee pollinators introduced to Chile: a review. IN: Kevan, P. & Imperatriz Fonseca, V.L. (eds) - *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature* - Ministry of Environment / Brasília. p.155-167.
- Salvarrey S, Arbulo N, Santos E, Invernizzi C. 2009. Constancia floral en los abejorros nativos *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus*. Tesis de Licenciatura de Ciencias Biológicas opción Etología. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay. 39 p.
- Schmid-Hempel P. 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften* 88: 147-158.
- Shepherd M, Buchmann SL, Vaughan M, Hoffman Black S. 2003. *Pollinator conservation handbook*. The Xerces Society. Portland, Oregon, USA.
- Shuel RW. 1992. The production of néctar and pollen. In: *The hive and the honey bee*. Graham JM. (ed.). Dadant & Sons, Hamilton, Illinois.
- Sladen FWL. 1912. The humble-bee. Its life-history and how to domesticate it. MacMillan and Co., London. 283p.
- Starling TM, Wilsie CP, Gilbert NW. 1950. Corolla tube length studies in Red Clover. *Agronomy Journal*. Vol. 42:1- 8.

- Torres E, Gomez J. 2009. Evaluación de diferentes tipos de dieta para la iniciación de colonias de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) en cautiverio. Trabajo de grado. Universidad Militar Nueva Granada, Colombia.
- van den Eijnde J, de Ruijter A, van der Steen J. 1991. Method for rearing *Bombus terrestris* continuously and the production of bumblebee colonies for pollination purposes. *Acta Horticulturae* 288: 154-158.
- van Doorn A. 2006. Factores que influyen en el funcionamiento de las colonias de abejorros en invernadero. En: Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas, pp: 158-171. Ed.: CIFA La Majonera- La Cañada IFAPA. La Majonera (Almería), España.
- Varela G, Rebuffo M. 1999. Utilización de abejorros (*Bombus* sp) para aumentar la producción de semilla de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en túneles de aislación. Montevideo, Uruguay. PROVA/INIA. 41 pp.
- Velthuis HHW, van Doorn A. 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37: 421–451.
- Velthuis HHW. 2002. The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction to agriculture. IN: Kevan P, Imperatriz Fonseca, V.L. (eds.) – *Pollinating Bees – The Conservation Link Between Agriculture and Nature*- Ministry of Environment, Brasilia, pp. 177-184.
- Williams PH, Cameron SA, Hines HM, Cederberg B, Rasmont P. 2008. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39: 46- 74.
- Woodrow AW. 1952. Pollination of the red clover flower by the honey bee. *Journal of Economic Entomology*, 45: 1028-1029.
- Yoon HJ, Lee KY, Lee SB, Park IG. 2010a. Wake-up treatments for improving oviposition and colony development of the bumblebees *Bombus ignitus* and *B. terrestris*. *International Journal of Industrial Entomology*, 20(1): 19-24.

Yoon HJ, Lee KY, Hwang JS, Park IG. 2010b. Chilling temperature and humidity to break diapause of the bumblebee queen *Bombus terrestris*. *International Journal of Industrial Entomology*, 20(2): 93-98.

## 8. ANEXOS

Artículo presentado en Agrociencia Uruguay.

### **Cría artificial de abejorros nativos *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* (Hymenoptera, Apidae)**

Salvarrey, S.<sup>1</sup>, Arbulo, N.<sup>2</sup>, Santos, E.<sup>1</sup>, Invernizzi, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de la República, Sección Etología, Facultad de Ciencias. Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: [lepetite22@gmail.com](mailto:lepetite22@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidad de la República, Centro Universitario de la Región Este, Sede Rocha. Rincón esquina Florencio Sánchez, CP 27000, Rocha, Uruguay.

**Cría artificial de abejorros nativos *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus*  
(Hymenoptera, Apidae)**

**Resumen**

Los abejorros del género *Bombus* son excelentes polinizadores que contribuyen al mantenimiento de muchos ecosistemas y a la producción de cultivos comerciales. La cría comercial de abejorros se realiza desde hace 30 años con algunas especies euroasiáticas y norteamericanas. Uruguay cuenta con dos especies nativas de abejorros: *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* cuya cría artificial es considerada difícil. Durante la primavera y verano de los años 2009-2010 y 2010-2011 se realizaron experiencias de cría con ambas especies de abejorros. La cría se inició con reinas fecundadas recién salidas de su hibernación capturadas en primavera. Estas se colocaron dentro de cajas de madera de 5x10x10 cm con una pelota de polen de 1,5-2 cm de diámetro y jarabe de azúcar al 50 %, y se mantuvieron en una estufa a 28 °C. La experiencia del período 2009-2010 se inició con 42 reinas (40 *B. atratus* y 2 *B. bellicosus*) y la del período 2010-2011 con 89 reinas (82 *B. atratus* y 7 *B. bellicosus*). El 21,5 y 30,3% de las reinas en la primera y segunda experiencia respectivamente, tuvieron al menos una obrera. La mayor pérdida de reinas se constató en el período transcurrido desde la introducción de la reina en la caja hasta el comienzo de la oviposición (64,3 y 53,9 % para la primera y segunda experiencia, respectivamente). Los resultados obtenidos en estas experiencias a pequeña escala se encuentran en el rango de los reportados en condiciones similares para otras especies de abejorros.

**Palabras clave:** *Thoracobombus*, crianza, polinizadores, Uruguay

## **Artificial breeding of native bumblebees *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* (Hymenoptera, Apidae)**

### **Summary**

Bumblebees (*Bombus*) are excellent pollinators that contribute to the maintenance of many ecosystems and commercial crop production. Commercial rearing of bumblebees has been performed for 30 years with some Eurasian and Northamerican species. Uruguay has two native bumblebees: *Bombus atratus* y *B. bellicosus* whose artificial rearing is considered difficult. During the spring and summer of 2009-2010 and 2010-2011 breeding experiments were performed with both species of bumblebees. Experiences started with mated queens recently emerged from hibernation captured during spring. Queens were placed in wooden boxes of 5x10x10 cm with a pollen ball of 1.5-2 cm diameter and sugar syrup 50 %, and were kept in an oven at 28°C. The 2009-2010 experience started with 42 queens (40 *B. atratus* and 2 *B. bellicosus*) and the 2010-2011 experience with 89 queens (82 *B. atratus* and 7 *B. bellicosus*). The 21.5 and 30.3 % of the queens in the first and second experience respectively, had at least one worker. The greatest loss of queens was found in the period from the introduction of the queen in the box until the onset of oviposition (64.3 and 53.9 % for the first and second experience, respectively). Results obtained in these small scale experiences are in the range of those reported under similar conditions for other bumblebee species.

**Key words:** *Thoracobombus*, rearing, pollinators, Uruguay

## Introducción

Los abejorros del género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) son insectos eusociales de ciclo anual que juegan un rol importante en el mantenimiento de muchos ecosistemas y en la producción de diversos cultivos por su enorme capacidad como polinizadores (Michener, 1974; Free, 1993; Goulson, 2003; Heinrich, 2004).

Para Uruguay están citadas cuatro especies: *Bombus atratus*, *B. bellicosus*, *B. brasiliensis* y *B. morio* (Abrahamovich y Díaz, 2002; Abrahamovich *et al.*, 2004), todas ellas pertenecientes al subgénero *Thoracobombus* (Williams *et al.*, 2008). Sin embargo, en los últimos años sólo *B. atratus* y *B. bellicosus* han sido encontradas (Arbulo *et al.*, 2011).

A principio del siglo XX, el interés de investigadores por ampliar el conocimiento acerca de diversos aspectos de la biología de los abejorros impulsó el comienzo de la cría artificial de colonias de abejorros. En 1912, Sladen fue el primero en reportar resultados exitosos, logrando obtener colonias de algunas especies europeas del género a partir de reinas recolectadas al finalizar su hibernación y confinadas a recintos artificiales con suplementación de alimento y material aislante (Velthuis y van Doorn, 2006). Al mismo tiempo y en años siguientes, varios investigadores obtuvieron resultados similares en otras especies europeas y norteamericanas empleando básicamente la misma técnica pero utilizando diversos diseños de recintos, distintos materiales de aislamiento, diferentes maneras de estimular a las reinas y varias formas de mantener a las reinas durante su hibernación (Plath, 1923; Frison, 1927). A lo largo del siglo XX, numerosos estudios contribuyeron a mejorar la técnica de cría, desarrollando métodos para controlar cada uno de los pasos del ciclo de vida de los abejorros y así alcanzar un completo proceso de domesticación. Entre éstos se pueden destacar los avances obtenidos en la década del 60 en cuanto a las condiciones adecuadas de temperatura, iluminación y humedad para inducir a las reinas a iniciar una colonia (Velthuis y van Doorn, 2006) lo que permitió la cría en total confinamiento y potencialmente su realización durante todo el año. Lograr el apareamiento de machos y hembras en laboratorio también fue un paso importante en la domesticación de los abejorros (Duchateau, 1985). El desarrollo de una metodología que permitió evitar o cortar la diapausa de las reinas (Röseler, 1985) fue un progreso muy importante ya que posibilitó la generación

de un sistema de cría continuo a lo largo del año. Luego de varias décadas de investigación, la domesticación de los abejorros fue un hecho (Velthuis y van Doorn, 2006).

A fines de los 80 se inicia en los Países Bajos la comercialización de colonias de abejorros para la polinización de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en invernadero, principal cultivo en el que son utilizados hasta la actualidad (Velthuis, 2002; Velthuis y van Doorn, 2006). Desde entonces la comercialización de colonias se expandió principalmente en Europa y América del Norte, así como también en varios países asiáticos, en Nueva Zelanda y en Chile (Velthuis y van Doorn, 2006). Actualmente las colonias son comercializadas tanto para cultivos en invernadero como a campo entre los que se encuentran diversas hortalizas, frutales y forrajeras (Matheson, 1996; Velthuis y van Doorn, 2006; Estay, 2007).

En las últimas décadas, centros de investigación en distintas partes del mundo han continuado la investigación buscando mejorar la técnica de cría para hacerla más eficiente, generalmente trabajando con *B. terrestris*. Las investigaciones se han focalizado en desarrollar diferentes métodos de estimulación de la reina para que inicie un nido (Gretenkord y Drescher, 1997; Kwon *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2006), en estudiar la diapausa de las reinas (Beekman *et al.*, 1998; Beekman *et al.*, 1999) y en determinar las condiciones ambientales óptimas en las diversas etapas del ciclo de cría (Jie *et al.*, 2005; Duchateau, 2006; van Doorn, 2006; Yoon *et al.*, 2010a; Yoon *et al.*, 2010b; Amin y Kwan, 2011a; Amin y Kwan, 2011b).

A pesar de que la información acerca de la metodología general de cría está disponible en numerosos artículos científicos (Röseler, 1985; Ptacek, 1991; van den Eijnde *et al.*, 1991; Gretenkord y Drescher, 1997; Kwon *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2006; Ptacek y Drobna, 2006; Velthuis y van Doorn, 2006; Yoon *et al.*, 2010a; Amin y Kwan, 2011a; Amin y Kwan, 2011b) y en libros específicos del tema (Evans *et al.*, 2007) o de temas relacionados (Free, 1993; Matheson, 1996; O'Toole, 2003), los detalles que la hacen eficiente no son totalmente conocidos.

La cría artificial de abejorros puede realizarse a partir de reinas fecundadas recolectadas en el campo en primavera cuando emergen de su hibernación, lo que resulta en un 20 a 50 % de éxito en el inicio de la colonia; o, una vez que el sistema de cría está establecido, puede hacerse con reinas producto del mismo, que han sido apareadas e hibernadas en condiciones controladas, obteniéndose

en estos casos mayor éxito de inicio de colonia (Evans *et al.*, 2007). Las reinas fecundadas son confinadas en pequeños cajas-inicio y son aprovisionadas regularmente con jarabe de azúcar y una mezcla de polen fresco de abejas melíferas con jarabe. El diseño y el material de las cajas son variados, siendo madera y plásticos los más utilizados. Las medidas interiores en general no superan los 5x10x15 cm. Las reinas confinadas son mantenidas en total oscuridad o con iluminación roja a temperatura y humedad constantes; los rangos utilizados para estas variables van desde los 27°C a los 30°C y desde 50% a 70% de humedad relativa. Las reinas pueden ser colocadas solas o pueden utilizarse distintos métodos para una mayor estimulación de la puesta por parte de la reina. Colocar dos reinas juntas, una reina con algunas obreras de su especie o de otras especies del género, o con varias abejas melíferas recién emergidas, o con pupas de abejorro e incluso pupas artificiales, son algunos de los métodos que han sido utilizados. Una vez que la reina comienza a oviponer la cantidad de alimento suministrado va aumentando gradualmente, continuándose este incremento al emerger las obreras. Cuando la primer camada de obreras ha emergido (de 4 a 8 obreras), la colonia es transferida a cajas-nido de mayor tamaño. El diseño y el material de estas cajas-nido también son variables y muchas veces depende de la utilidad que se le dará a la colonia. Nuevamente, madera y plásticos son los materiales más frecuentemente utilizados y las dimensiones interiores son en general no menores a 20x20x15 cm. El nido puede mantenerse cerrado a temperatura controlada y provisto con suficiente alimento, o puede ser trasladado al campo y permitir a las obreras pecorear libremente para abastecer a la colonia (Evans *et al.*, 2007).

La mayoría de las especies que han sido y son criadas artificialmente en la actualidad, tanto para investigación como para su comercialización, son de origen euroasiático y norteamericano. La principal, es la especie euroasiática *Bombus terrestris*, que incluso es comercializada fuera de su rango geográfico natural llegando a Japón, China, Chile y Nueva Zelanda (Velthuis y van Doorn, 2006). Conociendo el riesgo que puede traer la introducción de especies exóticas (competencia con especies nativas, introducción de nuevos parásitos y enfermedades, entre otros) (de Ruijter, 1997; Goulson, 2003; Inoue *et al.*, 2008; Dafni *et al.*, 2010; Goulson, 2010), la mejor estrategia es intentar utilizar las especies nativas (Evans *et al.*, 2007; Ings *et al.*, 2006). La principal dificultad

para esto es que se debe adecuar la técnica para la cría de las especies nativas. Desde el comienzo de la domesticación de los abejorros es claro que no todas las especies pueden ser criadas con la misma facilidad (Plath, 1923). En este sentido, es sabido que la cría en condiciones controladas de las especies pertenecientes al grupo denominado “hacedores de bolsillo” (se refiere a la forma en que las crías son alimentadas), es más complicada y demandante que la del otro grupo denominado “almacenadores de polen” al cual pertenecen las cinco especies comercializadas en el mundo (Plath, 1923; Griffin *et al.*, 1991; Ptacek y Drobna, 2006; Velthuis y van Doorn, 2006). Las especies sudamericanas, incluidas *B. atratus* y *B. bellicosus* presentes en Uruguay, pertenecen al grupo “hacedores de bolsillo”. A pesar de las dificultades, es posible criar las especies de este grupo adecuando y mejorando la técnica, existiendo experiencias de cría exitosa en Brasil (Garófalo, 1979 en Varela y Rebuffo, 1999), Colombia (Aldana *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2008) y en Chile (Patricia Estay *com. pers.*).

En Uruguay la primera experiencia de cría artificial de abejorros fue reportada por Varela y Rebuffo (1999). Estas investigadoras, siguiendo la técnica sugerida en la bibliografía del momento, lograron que un alto porcentaje de las reinas de *B. bellicosus* utilizadas pusieran huevos, llegando al estado larval un 65,2% de las posturas y al estado adulto un 13% de la misma. A pesar de obtener resultados exitosos los trabajos fueron discontinuados. Transcurrido más de una década, en la Facultad de Ciencias un grupo de investigación, siguiendo la técnica sugerida en la bibliografía y las recomendaciones de investigadores chilenos, inició la cría de abejorros en laboratorio a pequeña escala de las dos especies nativas encontradas más comúnmente en el país. En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en las experiencias realizadas en dos temporadas.

## **Materiales y métodos**

Las experiencias de cría artificial de abejorros se realizaron durante los meses de primavera y verano de los años 2009-2010 y 2010-2011 en la Sección Etología de la Facultad de Ciencias.

La cría se inició con reinas fecundadas de *B. atratus* y *B. bellicosus* recién salidas de su hibernación, capturadas en los meses de primavera mientras se encontraban pecoreando. Las reinas, con no más de 24 horas de capturadas, se

colocaban dentro de cajas de madera (cajas de inicio) de 5x10x10 cm con paredes laterales de vidrio removibles. En un extremo de la caja de inicio se colocaba sobre una pequeña cajita de cartón una pelota de polen de 1,5-2 cm de diámetro elaborada con polen corbicular de abejas melíferas y jarabe de azúcar. En un orificio de la parte superior de la caja de inicio se insertaba un dispensador con jarabe de azúcar al 50%. Las cajas de inicio conteniendo las reinas fueron mantenidas a 28°C en una estufa de 180x50x50 cm. La fuente de calor de la estufa provenía de lámparas de color rojo, cuya luz no puede ser percibida por los abejorros.

Las tareas de mantenimiento se realizaron con la habitación oscurecida iluminando las cajas con luz roja para evitar perturbar a los insectos.

Cada 2-3 días se inspeccionaban las cajas de inicio registrando la situación de las reinas, las obreras y el nido, a la vez que se recambiaba el jarabe de azúcar. Si se encontraban celdas con el característico bolsillo lateral por donde los abejorros colocan el polen para alimentar a las larvas, éste se llenaba de una pasta de textura cremosa hecha con polen y jarabe de azúcar con ayuda de una jeringa.

Cuando las colonias contaban con aproximadamente 4-8 obreras, se transferían a cajas de madera de 40x20x20 cm. Estas cajas cuentan con una tapa de madera y una contratapa corrediza de vidrio que permite la observación y un buen acceso a la colonia. Las actividades de mantenimiento básicamente fueron las mismas que en la etapa anterior: recambio de jarabe y alimentación de larvas. Cuando las colonias superaban los 10 individuos se trasladaban al campo terminando con las actividades de mantenimiento.

Para el análisis de los datos se determinaron tres etapas en el proceso de cría:

Etapa 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición.

Etapa 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera.

Etapa 3: desde el nacimiento de la primera obrera a la finalización de las actividades de mantenimiento.

## **Resultados**

La experiencia del período 2009-2010 se inició con 42 reinas (40 *B. atratus* y 2 *B. bellicosus*) y la del período 2010-2011 con 89 reinas (82 *B. atratus* y 7 *B. bellicosus*).

A lo largo del proceso de cría el número de reinas que pasaban a las etapas 2 y 3 fue disminuyendo, verificándose la mayor reducción entre las etapas 1 y 2 (Figura 1). La experiencia del período 2010-2011 fue más eficiente que la del período 2009-2010 presentando un incremento en el número de reinas que tuvieron al menos una obrera (30,3 y 21,5%, respectivamente) (Figura 1).

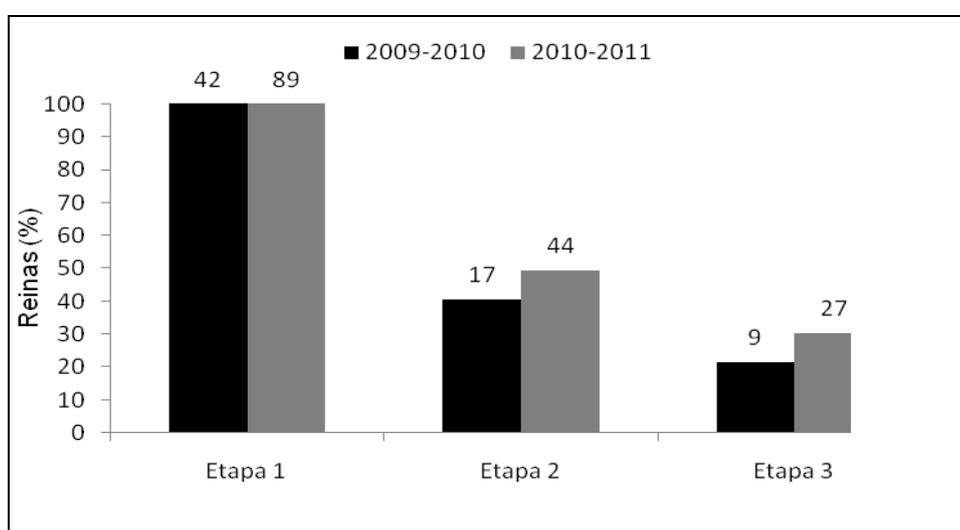


Figura 1. Porcentaje de las reinas iniciales en cada una de las etapas del proceso de cría. Etapa 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición. Etapa 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera. Etapa 3: desde el nacimiento de la primera obrera a la finalización de las actividades de mantenimiento.

Durante la experiencia del período 2009-2010 murieron 27 reinas (64,3% del número inicial) y en la del período 2010-2011 murieron 48 reinas (53,9% del número inicial). La Figura 2 muestra cómo se distribuyeron las reinas muertas entre las tres etapas de la cría. El mayor número de pérdidas de reinas en las dos experiencias ocurrió en la primera etapa, entre la introducción de las reinas a las cajas de inicio y el comienzo de la oviposición. Una vez iniciada la postura de

huevos la pérdida de reinas disminuyó en forma marcada, verificando en la última etapa menos del 7% del total de las reinas muertas.

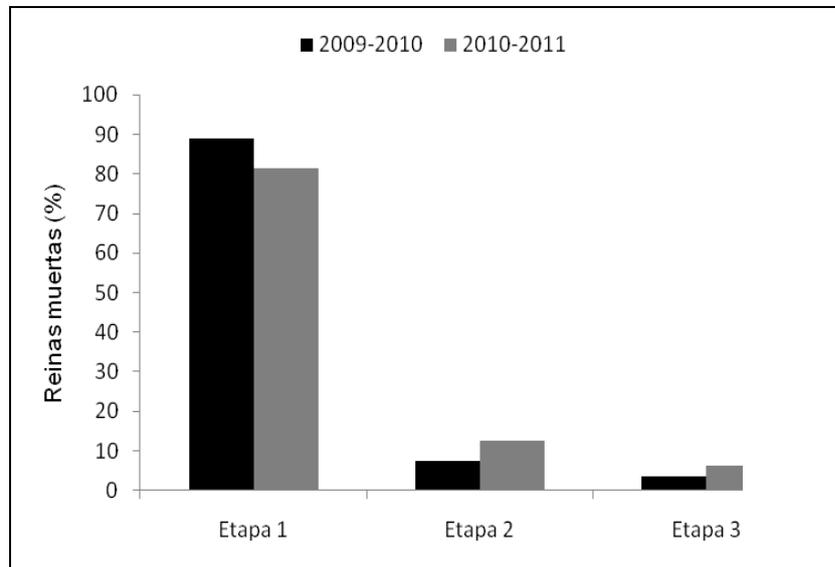


Figura 2. Distribución de las reinas muertas entre las tres etapas de la cría. Etapa 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición. Etapa 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera. Etapa 3: desde el nacimiento de la primera obrera a la finalización de las actividades de mantenimiento.

La duración de las etapas 1 y 2 se determinó analizando conjuntamente los registros de las dos experiencias. Tanto en *B. atratus* como en *B. bellicosus* la duración de las dos etapas mostró una gran variabilidad (Figura 3). Las reinas de *B. atratus* iniciaron antes la oviposición que las reinas de *B. bellicosus*, mientras que la duración del ciclo de cría de *B. atratus* fue en promedio casi 7 días más largo que el de *B. bellicosus* (Figura 3).

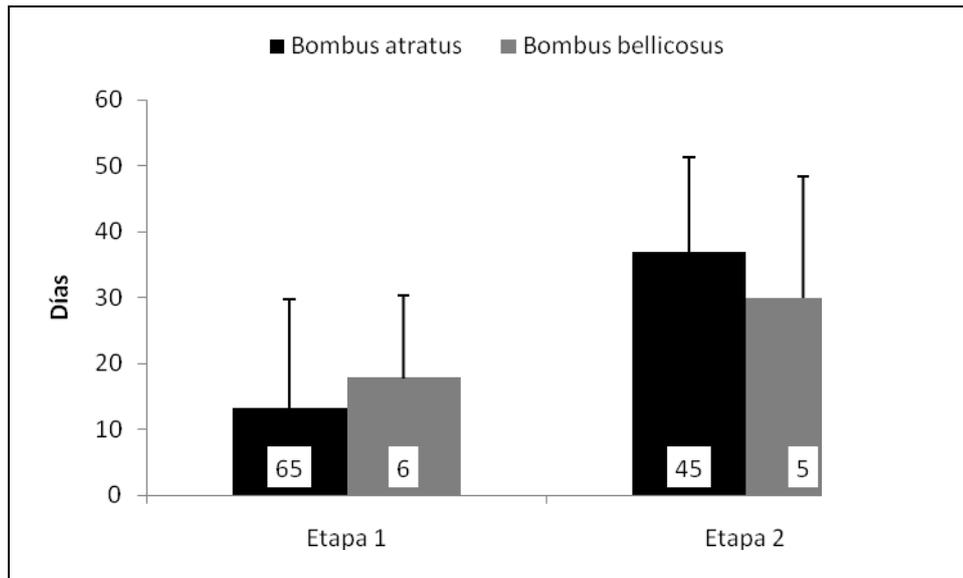


Figura 3. Duración de las etapas 1 y 2 de la cría para *B. atratus* y *B. bellicosus*. Etapa 1: desde la introducción de la reina en la caja de inicio al comienzo de la oviposición. Etapa 2: desde el comienzo de la oviposición al nacimiento de la primera obrera.

## Discusión

Las especies de abejorros que integran el grupo de “hacedores de bolsillo”, entre las que se encuentran *B. atratus* y *B. bellicosus* son consideradas difíciles de criar artificialmente (Plath, 1923; Griffin *et al.*, 1991; Ptacek y Drobna, 2006; Velthuis y van Doorn, 2006). Sin embargo, las dos experiencias de cría artificial a pequeña escala realizadas con estas dos especies de abejorros nativos mostraron resultados satisfactorios, consiguiendo formar colonias con el 21,5 y el 30,3% de las reinas iniciales en la primera y segunda experiencia, respectivamente. Estos resultados se encuentran dentro del rango de éxito de cría obtenido a partir de reinas capturadas en el campo (20 a 50%) reportado para especies euroasiáticas y norteamericanas del grupo de “almacenadores de polen” (Evans *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en las dos experiencias de cría son mejores que el reportado por Varela & Rebuffo (1999) para *B. bellicosus* (13%), siendo éste el único antecedente nacional de cría de abejorros.

La muerte de las reinas, especialmente en los días siguientes a introducirlas en las cajas de inicio, es el principal problema encontrado en las dos experiencias

de cría. Los abejorros son hospederos de una gran variedad de parásitos como virus, bacterias, hongos, protozoos, nematodos, himenópteros y dípteros parasitoides y ácaros (Schmid-Hempel, 2001). Es posible que en la situación de confinamiento en que se encuentran las reinas, sin poder realizar vuelos y defecando dentro de la caja, aumente la incidencia de diferentes patógenos y parásitos deteriorando su condición sanitaria. En este estudio frecuentemente se observaron ácaros sobre el cuerpo de las reinas. Los abejorros pueden albergar un número importante de ácaros que se transmiten verticalmente a través de la reina (Maggi *et al.*, 2011). Por otro lado, recientemente se ha encontrado en diferentes poblaciones de *B. atratus* y *B. bellicosus* de Uruguay una alta prevalencia del microsporidio *Nosema ceranae* (Natalia Arbulo, datos sin publicar). Este microsporidio se encuentra infectando a las abejas melíferas en todos los continentes (Klee *et al.*, 2007; Fries 2010; Aurori *et al.*, 2011) incluido Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2009) y podría estar afectando también a las poblaciones de abejorros.

En este estudio se determinaron dos parámetros relevantes de la biología reproductiva de *B. atratus* y *B. bellicosus*, como son el tiempo transcurrido entre el confinamiento de las reinas y el inicio de la oviposición, y entre la oviposición y el nacimiento de la primer obrera, que son importantes tener en cuenta en la cría artificial de abejorros. Ambos registros mostraron una alta variabilidad, pese a que las reinas se encontraban en condiciones controladas y uniformes. Es posible que el tiempo transcurrido entre la introducción de las reinas a las cajas de inicio y la construcción del nido, no sea representativo del que se da naturalmente como consecuencia de las condiciones completamente distintas en las que se encuentran las reinas. Además, no se conocía el tiempo transcurrido desde que la reina culminó su hibernación hasta que fue capturada, ni si había iniciado la oviposición. Ambos factores seguramente afecten el inicio de la puesta de huevos en las reinas confinadas. Sin embargo, el tiempo entre la oviposición y el nacimiento de la primera obrera podría ser similar al encontrado en la naturaleza. La duración de este ciclo de desarrollo varía dependiendo de la especie, de la temperatura y de la cantidad y calidad del alimento (Michener, 1974; Goulson, 2003; Heinrich, 2004). En este estudio se determinó que, bajo las condiciones de cautiverio utilizadas, la duración promedio del ciclo de cría de *B. atratus* es de 36,8 días y la de *B. bellicosus* es de 30 días. No se cuenta con

datos de la duración del ciclo en condiciones naturales para ninguna de estas especies. Por otro lado, en condiciones de cautiverio similares a las de este estudio, en Colombia la duración del ciclo de cría de *B. atratus* varía entre 24 días (Cruz *et al.*, 2008) y 33 días (Torres y Gómez, 2008 en Cruz *et al.*, 2008). La menor duración del ciclo de cría obtenida en estos trabajos podría deberse a que las poblaciones de *B. atratus* en Colombia tienen un ciclo más corto por estar adaptadas a un clima tropical. Otro factor que puede influir en esas diferencias, es la calidad del alimento que se le proporcionó a las larvas. Aunque en todos los casos fue una pasta de polen corbicular de abejas melíferas, este puede ser de orígenes botánicos muy diferentes y por tanto su calidad puede variar considerablemente (Roulston y Cane, 2000). Este es un aspecto esencial a tener en cuenta en futuras experiencias de cría ya que la calidad del alimento no sólo puede afectar la duración del ciclo, sino también el tamaño y el número de las obreras producidas y por ende, el desarrollo de la colonia.

El tiempo transcurrido entre el encierro de la reina en la caja de inicio y el nacimiento de la primera obrera, es de aproximadamente 50 días para ambas especies. Esta información es relevante para planificar la cría artificial de abejorros con vistas a obtener colonias en períodos definidos, por ejemplo para polinizar cultivos específicos. En futuros estudios se deben determinar las curvas de crecimiento poblacional para conocer el tiempo completo que insume obtener una colonia en condiciones adecuadas para ser trasladada al campo. De todos modos, teniendo en cuenta que las reinas empiezan a salir de la hibernación a comienzos de primavera, con los tiempos de cría mencionados anteriormente, no parece posible obtener colonias pobladas (por ejemplo con 50 obreras) antes de 90 días de la captura de las reinas. Esta dificultad se puede superar si la cría se inicia a partir de reinas fecundadas e hibernadas en el laboratorio durante el otoño. Esta técnica es usada ampliamente en la cría de abejorros para fines comerciales o de investigación ya que permite contar con colonias a lo largo del año (Velthuis y van Doorn, 2006; Evans *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2010a; Yoon *et al.*, 2010b) pero es necesario adaptarla para la cría de *B. atratus* y *B. bellicosus*. En las experiencias de cría realizadas, las colonias que contaban con más de 10 obreras se trasladaron al campo y no recibieron más alimento de forma controlada. En estas condiciones, se observó que el crecimiento poblacional se detenía y las colonias no conseguían sobrevivir demasiado tiempo. Es necesario

realizar nuevos estudios para mejorar el éxito del traslado de las colonias del laboratorio al campo. En este sentido, es posible que el problema se deba únicamente al pequeño tamaño de las colonias al momento de sacarlas del laboratorio.

En suma, este estudio muestra que es factible la cría artificial de las dos especies de abejorros nativos del Uruguay, *B. atratus* y *B. bellicosus*, generando la posibilidad de manejar las colonias para polinizar eficientemente diferentes cultivos.

### **Agradecimientos**

A la Sección Etología de Facultad de Ciencias por brindar el espacio para realizar las experiencias de cría; a la Cátedra de Entomología de Facultad de Agronomía y a la familia Sánchez-Santos por permitir mantener los nidos en sus predios una vez que se trasladaron al campo; al Laboratorio de Entomología del INIA La Platina de Chile por el asesoramiento y a CSIC por la financiación de las pasantías de Sheena Salvarrey y Natalia Arbulo en dicho laboratorio.

## Bibliografía

- Abrahamovich AH, Díaz NB.** 2002. Bumble bees of the Neotropical region (Hymenoptera: Apidae). *Biota Colombiana*, 3: 199 - 214.
- Abrahamovich AH, Díaz NB, Morrone JJ.** 2004. Distributional patterns of the neotropical and andean species of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 20: 99 - 117.
- Aldana J, Cure JR, Almanza MT, Vecil D, Rodríguez D.** 2007. Efecto de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) sobre la productividad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25: 62 - 72.
- Amin MR, Kwan YJ.** 2011a. Photoperiod and relationship with body mass and size in bumblebee, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) workers. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 46: 447 - 450.
- Amin MR, Kwan YJ.** 2011b. Time and age specific mating success of bumblebee (*bombus terrestris* L.) reared at different photoperiodic regimes. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 36: 13 - 20.
- Arbulo N, Santos E, Salvarrey S, Invernizzi C.** 2011. Effect of proboscis length on resource utilization in two Uruguayan bumblebees: *Bombus atratus* Franklin and *Bombus bellicosus* Smith (Hymenoptera, Apidae). *Neotropical Entomology*, 40: 72 - 77.
- Aurori CM, Dezmirean DS, Marghitas LA, Moritz RFA.** 2011. *Nosema apis* and *N. ceranae* in Western honeybee (*Apis mellifera*) – geographical distribution and current methods of diagnosis. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 68: 63 - 70.
- Beekman M., van Stratum P., Lingeman R.** 1998. Diapause survival and postdiapause performance in bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89: 207-214.
- Beekman M., van Stratum P., Veerman A.** 1999. Selection for non-diapause in the bumblebee *Bombus terrestris*, with notes on the effect of inbreeding. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 69-75.
- Cruz B, Cure JR, Almanza MT.** 2008. Implementación de mejoras para la cría en cautiverio de colonias del abejorro nativo *Bombus pauloensis* (= *B. atratus*) (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Facultad de Ciencias - Universidad Militar Nueva Granada*, 4: 70 – 83.

- Dafni A, Kevan P, Gross CL, Goka K.** 2010. *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45: 101 - 113.
- de Ruijter A.** 1997. Commercial bumblebee rearing and its implications. *Acta Horticulturae*, 437: 261 - 269.
- Duchateau MJ.** 1985. Analysis of some methods for rearing bumblebees' colonies. *Apidologie*, 16: 225 - 227.
- Duchateau MJ.** 2006. Aspectos biológicos del comportamiento de los abejorros. En: Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas. La Majonera (Almería), España, pp. 220-227.
- Estay P.** 2007. *Bombus* en Chile: especies, biología y manejo. Colección libros INIA N° 22. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura. Santiago de Chile, Chile.
- Evans E, Burns I, Spivak M.** 2007. Befriending bumble bees. A practical guide raising local bumblebees. University of Minnesota Extension, Minnesota, USA. 65p.
- Free JB.** 1993. Insect pollination of crops. (2ª Ed.). Academic Press, Londres, UK. 684p.
- Fries I.** 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 73 - 79.
- Frison TH.** 1927. Experiments in rearing colonies of bumblebees (*Bremidae*) in artificial nests. *Biological Bulletin*, 52: 51 - 67.
- Goulson D.** 2003. Bumblebees: their behaviour and ecology. *Oxford University Press*, UK. 236p.
- Goulson D.** 2010. Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America. *Applied Entomology and Zoology*, 45: 7 - 12.
- Gretenkord C, Drescher W.** 1997. Successful colony foundation and development of experimentally hibernated *Bombus terrestris* queens depending on different starting methods. *Acta Horticulturae*, 437: 271 - 276.
- Griffin RP, Macfarlane RP, van den Ende HJ.** 1991. Rearing and domestication of long tongued bumblebees in New Zealand. *Acta Horticulturae*, 288: 149 - 153.
- Heinrich B.** 2004. Bumblebee economics. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 251p.

- Holm N.** 1966. The utilization and management of bumble bees for red clover and alfalfa seed production. *Annual Reviews of Entomology*, 11: 155 - 186.
- Ings TC, Ward NL, Chittka L.** 2006. Can commercially imported bumblebees out-compete their native conspecific? *Journal of Applied Ecology*, 43: 940 - 948.
- Inoue MN, Yokoyama J, Washitani I.** 2008. Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation*, 12: 135 - 146.
- Invernizzi C, Abud C, Tomasco I, Harriet J, Mendoza Y, Ramallo G, Campá J, Katz E, Gardiol G, Mendoza Y.** 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 150 - 153.
- Jie W, Wenjun P, Jiandong A, Zhanbao G, Yueming T, Jilian L.** 2005. Techniques for year-round rearing of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apoidea) in China. *Journal of Apicultural Science*, 49: 65 - 69.
- Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ.** 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 1 - 10.
- Kwon YJ, Saeed S, Duchateau MJ.** 2003. Stimulation of colony initiation and colony development in *Bombus terrestris* by adding a male pupa: the influence of age and orientation. *Apidologie*, 34: 429 - 437.
- Kwon Y J, Than KK, Suh SJ.** 2006. New method to stimulate the onset of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) rearing: using worker helpers in the presence of frozen pupae. *Entomological Research*, 36: 202 - 207.
- Maggi M, Lucía M, Abrahamovich AH.** 2011. Study of the acarofauna of native bumblebee species (*Bombus*) from Argentina. *Apidologie*, 42: 280 – 292
- Matheson A.** 1996. Bumble Bees for pleasure and profit. *International Bee Research Association*, Cardiff, UK. 47p.
- Michener CD.** 1974. The social behavior of bees. A comparative study. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. USA. 404p.
- Plath OE.** 1923. Breeding experiments with confined *Bremus* (*Bombus*) queens. *Biological Bulletin*, 45: 325 - 341.

- O'Toole C.** 2003. Bumblebees. Gardens need bees; bees need homes. Osmia Publications. Rothley, UK.
- Ptacek V.** 1991. Trials to rear bumble bees. *Acta Horticulturae*, 288: 144 - 148.
- Ptacek V, Drobna J.** 2006. Cría y uso de los abejorros para la polinización de los recursos genéticos de legumbres forrajeras. En: Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas. La Majonera (Almería), España, pp. 124-138.
- Röseler PF.** 1985. A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (Apidae, Bombini) colonies in captivity. *Apidologie*, 16: 165 - 170.
- Roulston T, Cane JH.** 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. En: Dafni A, Hesse M, Paccini E. (Eds.). Pollen and pollination. Springer, Viena, Austria, pp. 187 - 209.
- Schmid-Hempel P.** 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, 88: 147 - 158.
- van den Eijnde J, de Ruijter A, van der Steen J.** 1991. Method for rearing *Bombus terrestris* continuously and the production of bumblebee colonies for pollination purposes. *Acta Horticulturae*, 288: 154 - 158.
- van Doorn A.** 2006. Factores que influyen en el funcionamiento de las colonias de abejorros en invernadero. En: Segundas Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas. La Majonera (Almería), España, pp. 158 - 171.
- Varela G, Rebuffo M.** 1999. Utilización de abejorros (*Bombus* sp) para aumentar la producción de semilla de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en túneles de aislación. Montevideo, Uruguay. PROVA/INIA. 41 pp.
- Velthuis HHW.** 2002. The historical background of the domestication of the bumblebee, *Bombus terrestris*, and its introduction to agriculture. En: Kevan P, Imperatriz Fonseca VL. [Eds.]. Pollinating bees – The conservation link between agriculture and nature. Brasilia : Ministry of Environment. pp. 177-184.
- Velthuis HHW, van Doorn. A.** 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37: 421 – 451.
- Williams PH, Cameron SA, Hines HM, Cederberg B, Rasmont P.** 2008. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39: 46 - 74.

**Yoon HJ, Lee KY, Lee SB, Park IG.** 2010a. Wake-up treatments for improving oviposition and colony development of the bumblebees *Bombus ignitus* and *B. terrestris*. *International Journal of Industrial Entomology*, 20: 19 - 24.

**Yoon HJ, Lee KY, Hwang JS, Park I.G.** 2010b. Chilling temperature and humidity to break diapause of the bumblebee queen *Bombus terrestris*. *International Journal of Industrial Entomology*, 20: 93 - 98.