

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE POLEN Y ENTRENAMIENTO OLFATIVO EN COLMENAS DE ABEJA MELÍFERA (*Apis mellifera* L.) SOBRE LA EFICACIA DE LOS SERVICIOS DE POLINIZACIÓN DEL CULTIVO DE MANZANO (*Malus domestica* Borkh).

I. Fundamentación y antecedentes.

El sector apícola en Uruguay, de acuerdo al Registro Nacional de Propietarios de Colmenas (RNPC) está compuesto por 2.438 apicultores y un total de 565.654 colmenas. En la década 2010-2020 se ha producido una continua disminución en el número de propietario, así como una mayor concentración en la cantidad de colmenas por propietario. Se observa para el mismo período una disminución del 27% del precio de la miel (principal fuente de ingresos del sector) en el mercado internacional (MGAP-OPYPA, 2021). Los servicios de polinización de cultivos, son otra fuente de ingresos del sector. La abeja melífera es el polinizador de cultivos más extendido y numéricamente más importante en el mundo (Watanabe, 1994; Dag et al. 2005). El servicio de polinización, a pesar de no producir un producto específico del sector apícola, es la actividad económica generadora de mayor valor realizada por el sector apícola (FAO, 2020). Se estima que el 80% de las especies de plantas cultivadas presentan en mayor o menor medida dependencia a la polinización por insectos y existe una demanda creciente de polinizadores debido al aumento de la superficie de cultivos dependientes (Aizen et al. 2019). En Uruguay se ha estimado el valor parcial atribuible a la abeja en 71,9 millones de U\$, de los cuales el 44, 9% se vincula al cultivo de manzana. Se observa que en promedio la abeja melífera aumentó el valor monetario de los cultivos en estudio un 70%. (Santos et al., 2009). La estimación actualizada a 2020, siguiendo la misma metodología y para el cultivo de manzana fue de 38,6 millones de U\$.

Varios factores explican la predominancia de *A. mellifera* en la práctica de servicios de polinización, entre las que se encuentran su fácil acceso debido a su distribución en todo el mundo (Aizen et al., 2009), actividad continua a lo largo del año (Knoll et al., 2020), eficiencia en el traspaso de polen entre plantas de la misma especie debido a la constancia floral (Stern et al., 2001; Stern et al., 2004), transporte de grandes cantidades de polen debido a la alta tasa de visitas (Garrat et al., 2016), la capacidad de interactuar con un elevado número de plantas debido a su morfología y comportamiento (Aslan et al., 2016). La capacidad de pecoreo se presenta en el rango de temperaturas de 13 a 38 °C y el vuelo se produce con velocidades máximas del viento de hasta 20 a 29 km.h⁻¹ (Vicens y Bosch, 2000a; Abou-Shaara, 2014). Adicionalmente, las elevadas poblaciones de las colmenas de entre 5.000 y 50.000 individuos permiten un transporte eficiente hacia los cultivos objetivo (FAO, 2020).

En Uruguay el manzano es el principal cultivo del rubro de frutales de hoja caduca. Representa los mayores porcentajes de superficie y producción, 50,06 y 60,02% respectivamente, y se ubica principalmente en los departamentos de Canelones, Montevideo y San José (MGAP-DIEA, 2021). Es una especie que presenta granos de polen pesados los cuales no son fácilmente transportados por el viento (Dennis, 2003), por lo que la polinización en esta especie es entomófila donde adicionalmente se ha

constatado que la mayoría de los cultivares son autoincompatibles y por lo tanto requieren de polinización cruzada para que el fruto cuaje (Degrandi-Hoffman et al., 1986). La exclusión de abejas a los árboles de manzano provoca reducciones significativas en el cuajado, rendimiento, número de frutos y semillas (Langridge and Jenkins, 1970; PerezMendez 2020).

El rendimiento del manzano aumenta de forma lineal en función del número de frutas (carga frutal) y la variable carga frutal es el factor determinante en la formación del rendimiento (Elfving y Schechter 1993). Similarmente, en condiciones nacionales se ha observado que la carga frutal presenta una relación lineal con el rendimiento, y a la vez las variables rendimiento y número de frutos por hectárea presentaron una fuerte correlación (0,87) (De Iacovo y Tachini, 2018). Estudios previos del grupo de ecofisiología de especies leñosas en el proyecto CSIC-AFRUPI (VUSP) "Determinación de los factores que limitan la productividad en cultivos de manzana de alto potencial" evidenciaron un bajo porcentaje de centros florales cuajados en los cultivares 'Cripp's Pink' y 'Gala' demostrando la necesidad de investigación sobre técnicas que permitan mejorar el cuajado en este cultivo para aumentar su carga frutal, mejorar la distribución de fruta y por lo tanto aumentar el rendimiento. La polinización es un evento clave en la producción de esta especie, estimulando el crecimiento y desarrollo del ovario y siendo el prerequisite para la fertilización de los óvulos, el desarrollo de semillas y frutos. Una polinización exitosa es crítica para obtener una producción adecuada de frutos (Ramirez y Davenport, 2013), y consiguientemente un alto rendimiento (Wünsche y Ferguson, 2005).

Las recomendaciones realizadas a los productores constan en la colocación de hasta 10 colmenas por hectárea, en bloques de 3 a 4, ingresadas al inicio de la floración y colocadas en zigzag en distintos puntos preferentemente dispuestos entre la variedad polinizadora y la variedad a polinizar (Santos et al., 2015). Si bien estas recomendaciones son conocidas en el sector productivo es frecuente encontrar situaciones donde se contratan cantidades sub-óptimas de colmenas (2 por hectárea), y/o manejos no recomendados, a pesar de que el servicio representa un porcentaje bajo en la estructura de costos de producción, entre 0,28 (Millán, Díaz y Ackermann, 2020) y 0,43% (Buschiazzo y Diaz, 2017). Estos hechos evidencian en parte la falta de conocimiento del sector acerca de la relevancia de esta práctica para obtener mayores rendimientos y calidad de fruta, que ha sido documentada extensivamente en distintas partes del mundo (Pardo y Borges, 2020). Por otra parte, los bajos porcentajes de cuajado alcanzados en el cultivo de manzana en condiciones nacionales cuestionan la efectividad de los servicios de polinización brindados actualmente.

El rendimiento del cultivo en el país ha mostrado un bajo incremento, 7% en el período comprendido entre 2000 y 2020, mientras que otras zonas productoras como, Chile, Brasil, Sudáfrica y Nueva Zelanda han registrado aumentos de hasta 96% en su rendimiento (FAO, 2022). Simultáneamente, el aumento de los principales componentes de los costos de producción, mano de obra, gasoil y energía eléctrica en el período 2011-2020, en 141, 36 y 64% respectivamente (Millán, Díaz y Ackermann, 2020), redundan en la tendencia observada en MGAP-OPYPA (2021) de desaparición de productores y

superficie cultivada, hecho que afecta directamente al sector apícola a través de la reducción de la demanda de servicios de polinización. Pese a la dependencia registrada por Santos et al. (2015) en la polinización del manzano por *A. mellifera* en condiciones nacionales, otros trabajos publicados estudian la incorporación de especies polinizadoras nativas (*Bombus atratus*) en combinación con abejas. Pérez-Méndez et al. (2020) obtienen mayores porcentajes de cuajado, número de semillas por fruto y número de frutos por árbol en tratamientos combinados de *A. mellifera* y *B. atratus* respecto a cuadros donde solo son utilizadas abejas.

En Uruguay existen empresas que ofrecen servicios de polinización con *B. atratus* en cultivos hortícolas, principalmente en tomate, frutilla y cucurbitáceas. El precio por la instalación de cada colmena de esta especie es de 260 U\$S (M. Darricarrere – Brometán Uruguay, com. pers.), teniendo en cuenta las recomendaciones de Pérez-Méndez et al. (2020) de 7 colmenas.ha⁻¹ el costo ascendería a 1820 USD.ha⁻¹, lo que representaría un aumento de 16,5% de los costos de producción promedio por hectárea descritos por Buschiazzo y Diaz (2017). La adopción de *B. atratus*, como polinizador en el cultivo de manzana en Uruguay es nula y la polinización en este cultivo sigue realizándose principalmente con *A. mellifera*.

El éxito de la polinización mediada por insectos depende de una compleja red de interacciones entre los organismos: la planta que recibe polen, la planta que lo provee y el vector que lo transporta entre las plantas (Kremen et al., 2007). Estas interacciones a su vez, están afectadas por factores concomitantes (Tamburini et al., 2019). Las condiciones climáticas que afectan la actividad de las abejas (Vicens y Bosch, 2000a). Los factores agronómicos que afectan al crecimiento de las plantas y su floración, como la disponibilidad de nutrientes minerales, sequías, presencia de plagas y enfermedades (Knight et al., 2005; Bos et al., 2007; Carisio et al., 2020) y de diseño del cultivo como la densidad y distribución espacial de las variedades polinizadoras (Sáez et al., 2018).

Existen factores intrínsecos al uso de *A. mellifera* como polinizador, que refieren a su comportamiento, genética, manejo de la densidad poblacional en el cultivo y su distribución. Estos factores afectan los servicios de polinización. Se ha demostrado que las abejas individuales poseen una constancia casi total frente a un mismo recurso floral durante los vuelos de forrajeo (Santos e Invernizzi, 2018), de modo que ingresar colmenas al cultivo antes de plena floración puede provocar que las abejas establezcan constancia en la flora arvense en lugar del cultivo objetivo. En las condiciones descriptas, se disminuye la actividad en el monte y consiguientemente el cuajado y el rendimiento (Stern et al., 2001; Stern et al., 2004). Adicionalmente, la eficiencia de la polinización se ve afectada dependiendo del recurso buscado por las abejas. Las abejas que colectan néctar lo hacen ingresando a la flor por el costado, sin contacto con el polen y por lo tanto reduciendo su eficacia como polinizadoras (Vicens y Bosch, 2000b; Stern et al., 2001; Dag et al., 2005; Santos et al., 2015; Santos e Invernizzi, 2018). Medidas de manejo como la introducción secuencial de colmenas a montes de manzana, y medidas que modifican la demanda de recursos de las colmenas como la alimentación artificial, trampas de polen y el aumento de panales de cría, aumentan la colecta de polen favoreciendo la

polinización (Stern et al., 2001; Santos e Invernizzi, 2018). Por otra parte, las cepas de abejas presentan diferentes niveles de preferencia al polen de manzana, registrado a través de la proporción de este en el total de polen colectado en colmenas. Se ha observado que esta preferencia se mantiene en la progenie por lo que se hipotetiza que las distintas cepas poseen distintos grados de sensibilidad a compuestos orgánicos volátiles de la flor o el polen resultando en que los recursos sean más o menos atractivos (Dobson y Bergström, 2000; Dag et al., 2005). Respecto a la distribución de colmenas en cultivos de manzano, Sáez et al. (2018) prueban mediante modelos de simulación de la polinización que colmenas homogéneamente distribuidas (en todos los bordes del cultivo) y árboles de la variedad polinizadora alternados en la misma fila que árboles de la variedad principal son la configuración que maximiza la producción del monte.

La polinización asistida o artificial, definida como la aplicación biológica o mecánica de polen compatible suplementario que ha sido colectado previamente, es una práctica utilizada para incrementar la cantidad y la calidad de la producción de frutas en distintos cultivos, bajo condiciones en las cuales la polinización natural se ve limitada Pinillos y Cuevas (2008). La técnica de polinización asistida comprende diversas metodologías de aplicación, desde la aplicación manual hasta el uso de maquinaria especializada (Eyles et al., 2022). La metodología de aplicación propuesta en este proyecto consiste en la utilización de abejas como vector de polen agregado en la entrada de las colmenas con la colocación de dispensadores. Esta técnica de aplicación posee la ventaja de ser de bajo costo, y ser altamente eficiente debido a que las abejas dirigen el polen hacia las flores en sus visitas de forrajeo. Su principal desventaja es la elevada dependencia a los factores que afectan la actividad de las colmenas, principalmente climáticos. Esta metodología es utilizada comercialmente en varios cultivos frutales de polinización entomófila (Pinillos y Cuevas, 2008; Eyles et al., 2022), y tiene el potencial de ser ofertada por el sector apícola en Uruguay. Williams et al. (1979) demuestran la efectividad de los dispensadores de polen utilizados en el cultivo de manzano a través del uso de marcadores genéticos para determinar los parentales de las semillas cuando se utilizan variedades con caracteres contrastantes. En ensayos en otros frutales como el peral europeo y el kiwi mediante dispensadores en colmenas de *Bombus terrestris* se han observado mayores valores de transferencia de polen y tamaño de fruto (Quinet et al., 2016; Pozo et al., 2018). La otra propuesta a evaluarse consiste en la aplicación de la técnica desarrollada por Farina et al. (2020) al cultivo de manzana. Esta técnica, desarrollada para el cultivo de girasol, se basa en la generación de un condicionamiento dentro de las colmenas producto de la alimentación de las mismas con mezclas sintéticas simples que simulan la composición de los volátiles orgánicos emitidos por la flor del cultivo. Esta mezcla al ser ofrecida en conjunto con una recompensa alimentaria (agua con sacarosa) ha demostrado una proporción significativamente mayor de vuelo de abejas y un aumento del porcentaje de polen recogido en las colmenas tratadas y consiguientemente logrando un aumento del rendimiento de hasta 57 % en ensayos en girasol (Farina et al., 2020). La mezcla específica para el cultivo de manzana se encuentra patentada desde el 2013 (Farina et al. 2013), y se ha demostrado que su formulación aumenta la actividad de las abejas observada en el número de entrada y salidas de la colmena y que sus componentes no

logran ser diferenciados por las abejas de la mezcla de volátiles natural de las flores de manzano.

El presente proyecto se enmarca en el estudio de la polinización asistida y es complementario al proyecto CSIC-Iniciación liderado por Bruno Wlasiuk que obtuvo financiamiento en la edición 2021 y que se enfoca en el efecto de técnicas de polinización asistida sobre la producción de manzana, fundamentalmente sobre las variables de cuajado y productivas. En esta propuesta se profundizará el estudio de las distintas técnicas, con un detallado análisis de la actividad de las abejas, evaluando comportamiento en campo y laboratorio, así como su efecto sobre la eficiencia de los servicios de polinización mediante el uso de estrategias de análisis geoestadístico, enfoque de estudio novedoso en dicha área tanto a nivel regional como internacional (Oliver y Webster, 2013; Teodorescu, Moise y Cosac, 2016). Ajustándose a la demanda de conocimiento por el sector apícola, se evaluará también el beneficio como consecuencia de la modificación del servicio de polinización estándar, calculándose los beneficios marginales obtenidos en función de los tratamientos aplicados a las colmenas (Delaplane et al., 2013; Geslin et al., 2017).

II. Descripción del problema a ser abordado y relevancia del mismo para el/los actores/s del ámbito social o productivo que conforma/n la Contraparte.

Las abejas (*Apis mellifera*) son el principal polinizador en el cultivo de manzana y presenta limitantes vinculadas tanto a prácticas de manejo como a condiciones climáticas que reducen la eficacia de la polinización. El manzano es la principal especie de frutales de hoja caduca de Uruguay, la mayoría de los cultivares son autoincompatibles y requieren de polinización cruzada para que la fruta cuaje. Para obtener una elevada carga frutal y por lo tanto un mayor rendimiento es indispensable obtener un elevado cuajado de frutos, siendo la polinización un factor determinante. Estudios realizados por el grupo disciplinario de ecofisiología de especies leñosas de la Facultad de Agronomía durante el periodo 2017-2020 en 24 huertos comerciales han evidenciado un bajo porcentaje de cuajado con mínimos de 2 % para la variedad Cripp's Pink y 0,5 % para la variedad Gala (datos sin publicar).

La polinización asistida ha sido implementada en otros países de forma comercial en varias especies de frutales, entre ellas el manzano. Esta práctica está siendo recientemente estudiada en Uruguay y no está disponible comercialmente aún. Actualmente, los grupos de trabajo de Ecofisiología de especies leñosas (Fagro) en colaboración con el área de Palinología (Fcién) llevan adelante trabajos en esta línea de investigación enfocados en el aumento de rendimiento en el cultivo de manzana, los cuales dan marco y se retroalimentan con los objetivos de este proyecto.

El estudio y la implementación de nuevas prácticas de manejo determinan la necesidad de evaluar en profundidad el comportamiento de las colmenas y los aspectos vinculados al beneficio del sector apícola en relación a la polinización de cultivos y sus posibles

mejoras. En este sentido el proyecto presentado, incorpora al trabajo interdisciplinario liderado por el área de Ecofisiología de cultivos de la Facultad de Agronomía, la participación de la sección Etología de la Facultad de Ciencias y del grupo de Ecología Química de Facultad de Química. La colaboración entre los grupos de investigación de UDELAR y los investigadores liderados por el Dr. Farina (UBA) permitirá el uso del producto patentado para el cultivo de manzana de forma experimental. Se espera que el presente proyecto provea al sector apícola de información relevante que sustente la implementación futura de las metodologías propuestas en la oferta de servicios de polinización de cultivos.

Por su parte, la Sociedad Apícola Uruguaya que nuclea a más de 1000 apicultores a nivel nacional y que tiene entre sus cometidos fomentar y defender los intereses del sector apícola, es contraparte del presente proyecto. Esta institución fomenta la producción de productos y servicios de la colmena, el consumo de productos apícolas, la enseñanza, extensión y toda actividad académica referida al sector. Las metodologías de polinización asistida mediante el agregado de polen foráneo y el entrenamiento olfativo de colmenas evaluadas en este proyecto tienen el potencial de ser prácticas utilizadas por el sector apícola en su oferta de servicios de polinización mejorando y estandarizando los servicios brindados. Se espera que los resultados de este proyecto contribuyan a la mejora y estandarización de los servicios de polinización de cultivos y favorezcan el proceso de conformación de una cámara de polinizadores que está siendo iniciado por dicha institución.

En esta oportunidad los ensayos se centran en el cultivo de manzana, sin embargo, las metodologías propuestas tienen la potencialidad de adaptarse a otros cultivos polinizados por abejas. De esta forma, el presente trabajo tiene el potencial de ser utilizado como un marco metodológico útil para la investigación y adaptación de estas técnicas en otros cultivos a los que la SAU ofrece sus servicios de polinización, y que se integrarán a la mencionada cámara de polinizadores.

III. Objetivos generales y específicos.

Objetivo general.

Evaluar las estrategias de polinización asistida en la mejora de la producción de cultivos y el beneficio económico atribuible a la polinización en el sector frutícola y apícola.

Objetivos específicos.

- 1-Evaluar el efecto del entrenamiento de colmenas sobre la actividad de las abejas, la polinización y la producción de manzana.
- 2-Evaluar el efecto de la adición de polen a las colmenas sobre la actividad de las abejas, la polinización y la producción de manzana.

- 3-Evaluar el efecto de las técnicas de entrenamiento de colmenas y adición de polen en el beneficio económico atribuible a la modificación de la polinización.
- 4-Determinar la variación espacial de la actividad de las abejas y las variables utilizadas en el cálculo de rendimiento, mediante herramientas de geoestadística.

IV. Estrategia de investigación, metodología y actividades específicas.

Estrategia de investigación

El proyecto se basa en el abordaje interdisciplinario de un sistema que involucra aspectos de la apicultura, la producción vegetal en sus dimensiones ecofisiológica y productiva, la etología de insectos y la ecología química. El enfoque interdisciplinario permitirá, además de la evaluación de los resultados productivos tanto en el ámbito apícola como frutícola, el análisis de las variables que explican las diferencias en los resultados y permitirán construir estrategias de mejora de los servicios de polinización. La combinación de herramientas de investigación clásicas en la valoración de los aspectos productivos y actividad de abejas, con técnicas de respuesta de extensión de la probóscide realizadas en laboratorio y la incorporación de análisis geoestadísticos a las variables evaluadas en campo, generan un estudio novedoso a nivel regional y mundial.

Metodología

Actividades de campo

Las actividades propuestas se realizarán en montes de manzana la variedad Cripp's Pink en el departamento de San José. Los cuadros de manzana a utilizar serán evaluados previamente y seleccionados en base a la uniformidad de los criterios: edad, distancia de plantación, porcentaje de polinizadores, condición de plantación, suelos, cultivos del entorno, estatus nutricional, estatus hídrico de la planta o suelo, porcentaje de brotación vegetativa y reproductiva, y presencia de plagas y enfermedades.

Cada cuadro del ensayo contará con una densidad de 4 colmenas.ha⁻¹ (75 colmenas en total) de *A. mellifera*. Con el fin de reducir el error experimental las colmenas utilizadas serán previamente homogeneizadas en cuanto a su número de crías (abierta y total), población adulta, superficie de cuadros y polen en reserva, para ello se seguirá el procedimiento clásico de uniformización de fuerza de colonia descrito por Delaplane, van derSteen y Guzman-Novoa (2015). Mediante el mismo procedimiento serán uniformizadas las condiciones sanitarias de las colmenas. Las colmenas se ubicarán igualmente distribuidas en todos los cuadros, a excepción de un tratamiento donde las colmenas serán colocadas en agrupadas en un solo borde del cuadro.

En todas las temporadas del cultivo se registrarán las variables ambientales, precipitación, humedad relativa, temperatura y heliofanía con registros horarios durante el período de floración.

Tratamientos

Los tratamientos se dispondrán en bloques completos al azar, cada bloque esta compuesto por superficies de cultivo de entre 15 y 20 ha, dentro de los cuales se aleatorizarán los tratamientos, que serán implementados en superficies de 1 ha. Se contará con 3 repeticiones y los tratamientos serán:

- 1- Testigo, colmenas distribuidas sin tratamientos
- 2- Entrenamiento de colmenas, colmenas distribuidas y con condicionamiento olfativo
- 3- Suplementación de polen, colmenas distribuidas y con suplementación de polen
- 4- Combinado, colmenas distribuidas con condicionamiento olfativo y suplementación de polen
- 5- Agrupado, colmenas agrupadas en un punto (manejo del productor)

En los tratamientos 2 y 4 la aplicación de la mezcla sintética de volátiles de flores de manzana y solución de sacarosa será aplicada en el momento de instalación de colmenas en el monte. Las dosis utilizadas serán de $50 \mu\text{l.l}^{-1}$ de la mezcla de volátiles y 1 l de solución 1:1 de agua-sacarosa en cada una de las colmenas, según la recomendación de la patente (Farina et al. 2013). Según lo indicado por el Dr. Farina este tratamiento se repetirá en todos los casos cada 10 días durante el periodo de floración.

En los tratamientos 3 y 4 la suplementación de polen se realizara colocándolo en dispensadores en la entrada de la colmena a una dosis de 150 g.ha^{-1} . La dosis será subdividida en todas las colmenas asignadas dentro de cada repetición de estos tratamientos. El polen será suministrado según la evolución fenológica de la floración de cada cuadro, pudiendo ser aplicado en 1 o más días dependiendo de la concentración de la floración. El polen aplicado será de manzana 'Red Delicious', esta variedad no está presente en el área de estudio y es completamente compatible con 'Cripp's Pink' debido a que no comparten ninguno de los alelos-S (Matsumoto et al. 2003; Broothaerts et al. 2004).

VARIABLES A MEDIR

-Procedencia de las abejas dentro del área delimitada de cada tratamiento:

Todos los tratamientos serán identificados mediante el marcado con pigmentos fluorescentes aplicados en las colmenas utilizadas (Hagler et al., 2011). Durante el periodo de floración de cada ciclo del cultivo se realizara un muestreo de 300 abejas en cada repetición, capturadas durante el vuelo, las cuales serán congeladas y analizadas posteriormente mediante el uso de luz ultravioleta.

-Las variables del cultivo, N° de flores, actividad de las abejas, calibre ecuatorial final, peso final, carga frutal y número de semillas por fruto, serán evaluadas en todas las repeticiones en una grilla de 100 árboles dentro del total de la superficie de cada cuadro. Se georeferenciará la ubicación de los árboles y colmenas utilizadas en todas las repeticiones.

Actividades de laboratorio

- Determinación de la viabilidad del polen.

Se evaluará la viabilidad del polen a aplicarse en cada ciclo del cultivo mediante la tinción diferencial propuesta por Peterson et al. (2010) y posteriormente se identificará mediante

observación por microscopio el porcentaje de granos de polen viable, según la metodología sugerida por Delaplane et al. (2013).

- Determinación de la efectividad de la mezcla sintética de volátiles de manzana:

En ambos años de estudio se determinará la similitud percibida por las abejas utilizadas en el proyecto de la mezcla sintética y el aroma natural de flores de manzana mediante ensayos de extensión de la probóscide (PER), mediante los cuales también será determinado el tiempo de retención de memorias adquiridas durante el condicionamiento con mezcla sintética de manzana (Falsenberg et al., 2011).

Colecta in vivo de volátiles florales:

Los volátiles emitidos por las flores se muestrearán *in vivo* durante 8 horas, mediante arrastre por un flujo de aire (1 L/min) pasando a través de bolsas inertes que incluirán las flores (y hojas). Este flujo se logra mediante bombas de muestreo personal Apex2 (Casella Cel). De igual forma se colectarán volátiles de hojas, a efectos comparativos. Los compuestos se adsorberán en columnas de Hayesep-Q 80/100 mesh. Los volátiles se eluirán del adsorbente con 1 mL de hexano y serán concentrados con nitrógeno a 100 μ L para ser analizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS). (Tholl et al., 2006).

Caracterización química:

Los volátiles florales se tipificarán por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS Shimadzu QP2010 Plus). Para la identificación de los componentes individuales de los volátiles florales, se analizarán los patrones de fragmentación obtenidos en el análisis por GCMS y se compararán los datos con aquellos existentes en las bibliotecas de espectros de masas [NIST 008, Shim 2205 (Adams)]. Para corroborar identificaciones, se calcularán los Índices de Retención utilizando como patrón una solución de una serie de n-alcanos C8-C32 + C19 inyectada en el mismo equipo y en las mismas condiciones que las muestras.

Análisis de datos:

Dado que algunas de las variables evaluadas no presentan distribución normal se utilizarán modelos lineales generales y modelos generalizados mixtos para el análisis estadístico de los datos. Se realizará también un análisis geoestadístico de los datos obtenidos en campo. La combinación de estrategias en el análisis de los datos obtenidos en el proyecto contribuirá a la incorporación de nuevas técnicas de análisis a los datos de polinización y su efecto sobre el rendimiento de los cultivos.

Actividades específicas:

Objetivos 1 y 2:

La actividad de las abejas en el cultivo será evaluada en todos los tratamientos en las 2 temporadas de cultivo durante el periodo de floración en 5 momentos. La medición de actividad de las abejas se cuantificará en los 100 árboles seleccionados por cuadro, de acuerdo al método propuesto por Geslin et al. (2017). Se seleccionará 1 rama por árbol (con aproximadamente 50 flores) en la cual se registrará el número total de flores y las visitas de abejas en periodos de 5 minutos. La actividad de las abejas se registrará como número de visitas.flor⁻¹.min⁻¹. La polinización será evaluada a través del conteo de número de semillas.fruto⁻¹ en una muestra aleatoria de 10 frutos en 100 árboles (en total 3000

frutos.tratamiento⁻¹). En los mismos frutos se registrara el calibre final alcanzado, este dato será utilizado en conjunto con el valor de numero de frutos totales.árbol⁻¹ para estimar el rendimiento en cada repetición.

Objetivo 3:

La determinación del diferencial de beneficio atribuible a las técnicas de entrenamiento y adición de polen en colmenas se realizara durante el periodo de cosecha de ambas temporadas mediante el cálculo propuesto por Delaplane et al. (2013):

$$\Delta P = P_t - P_c$$

Donde, ΔP = diferencia del beneficio respecto al servicio de polinización convencional

P_t = beneficio producto de la polinización con colmenas entrenadas o adición de polen

P_c = beneficio producto de la polinización convencional

De la misma forma se realizará este cálculo para evaluar la diferencia entre P_t y el beneficio del tratamiento testigo y el tratamiento 4 (P_{cm}) y la diferencia $P_{cm} - P_c$.

El cálculo de beneficio de cada tratamiento y testigos se realizara mediante la ecuación propuesta por Geslin et al. (2017):

$$P = (w * f * d * c * v) - (col * p) - (w * f * d * v * pc)$$

Donde, P = beneficio del productor

w = peso medio de frutos cosechados.árbol⁻¹

f = número total de frutos.árbol⁻¹

d = número de árboles.ha⁻¹

c = categoría de precio en función del peso de fruto

v = proporción de la producción vendida

col = número de colmenas.ha⁻¹

p = precio de renta de la colmena (incluyendo o no el costo del entrenamiento y polen en función del tratamiento)

pc = costos de producción.ha⁻¹ sin considerar el costo de la polinización

El peso medio de frutos, tamaño y porcentaje de frutos.categoría⁻¹ se estimara mediante el muestreo aleatorio de 10 frutos.árbol⁻¹ (3000 frutos.tratamiento⁻¹). El valor de número total de frutos por árbol será determinado previo a la cosecha.

Objetivo 4:

El objetivo 4 se relaciona a aspectos metodológicos en el estudio de la polinización de cultivos. Serán utilizadas herramientas de geoestadística para el análisis de la variación espacial de la actividad de las abejas y las variables utilizadas en el cálculo de rendimiento (Oliver y Webster, 2013). Los muestreos serán realizados en grillas de 100 árboles por ha. Se obtendrá el semivariograma empírico y sobre éste se ajustará, por el método de mínimos cuadrado ponderados (WLS), distintos modelos de semivariograma. Se evaluarán los modelos exponencial, esférico y gaussiano. La suma de cuadrado del error (SCE) será el criterio usado para la selección del modelo que mejor ajusta el

semivariograma empírico. Posteriormente, utilizando el método de interpolación kriging, se obtendrá el mapa de variabilidad espacial del rendimiento y actividad de abejas.

V. Personal asignado al proyecto y personal a contratar.

- Vivian Severino 10 h

Será la responsable de la ejecución del proyecto. Coordinará y participará de las instancias de campo, procesamiento de datos y discusión de avances y resultados, propiciando una estrecha comunicación y colaboración entre el equipo de trabajo. Será la responsable de la entrega de informes de avance y la coordinadora de las instancias de transferencia al sector. Por otra parte será responsable junto a él o los estudiantes de posgrado de la escritura y presentación de los artículos que se generen en relación a los temas del proyecto.

- Mercedes Arias 5 h

Colaborará en la ejecución del proyecto con énfasis en las instancias de campo y discusión. Sus aportes en tanto a los tópicos ecofisiológicos son gran relevancia para el desarrollo del proyecto. Colaborará en las instancias de planificación, discusión y elaboración de materiales de difusión técnica y científica.

- Contrato en Facultad de química 20 h (3 meses al año)

Colaborará en la ejecución del proyecto con énfasis en las actividades vinculadas a las temáticas de preparación y uso de mezclas de volátiles de flores y ensayos dePER. Durante los períodos de mayor actividad de campo, contribuirá también en las actividades de campo. Colaborará en las instancias de, discusión y elaboración de materiales de difusión.

- Carmen Rossini 5 h / Andrés González 5 h

Colaborará en la ejecución del proyecto con énfasis en las actividades vinculadas a las temáticas de preparación y uso de mezclas de volátiles de flores y ensayos dePER. Colaborará en las instancias de planificación, discusión y elaboración de materiales de difusión técnica y científica.

- Estela Santos 5 h

Colaborará en la ejecución del proyecto con énfasis en la planificación y discusión de actividades fundamentalmente vinculadas a las temáticas de preparación, acondicionamiento y estandarización de colmenas. Colaborará en las instancias de planificación, discusión y elaboración de materiales de difusión técnica y científica.

- Bruno Wlasiuk 20 h

Como ayudante de investigación tendrá como actividades centrales la participación en las instancias de planificación, la recopilación de información de campo, el procesamiento de datos y la participación en las instancias de discusión. Colaborará en todas las tareas relacionadas al proyecto, constituyendo ésta una instancia de formación de gran relevancia para sus estudios de posgrado y vinculación con el sector productivo.

- Pablo Cracco 2 h

Apoyará la planificación de actividades de campo con énfasis en el manejo de colmenas y sus variables asociadas en conjunto con el Ing. Agr Arnaldo Moreni.

VI. Realización de tesis de grado y/o posgrado en el marco de la investigación.

El proyecto permitirá complementar y añadir análisis a la tesis de maestría de Bruno Wlasiuk en la temática de polinización artificial y métodos de mejora del cuajado y rendimiento del cultivo de manzana. Adicionalmente permitirá la realización de por lo menos una tesis de grado.

VII. Cronograma de ejecución especificando los resultados a obtener en cada etapa.

| Actividad | 2022 | | | | 2023 | | | | | | | | 2024 | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|---------|-----------|-----------|-------|---------|-------|-------|------|-------|-------|--------|-----------|---------|-----------|-----------|-------|---------|-------|-------|------|-------|-------|--------|--|
| | Setiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre | Enero | Febrero | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Setiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre | Enero | Febrero | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | |
| Adquisición de materiales | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Selección de cuadros para ensayos | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Instalación de ensayos | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | |
| Registro de la evolución fenológica de árboles seleccionados | | x | x | x | | | | | | | | | | x | x | x | | | | | | | | | |
| Determinación de viabilidad del polen | | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | |
| Evaluación de actividad de las abejas en el cultivo | | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | |
| Determinación de procedencia de las abejas | | | x | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | |
| Evaluación de PER | | | x | x | x | | | | | | | | | | x | x | x | | | | | | | | |
| Evaluación de cosecha, rendimiento y análisis económico | | | | | | | | x | x | x | | | | | | | | | | x | x | x | | | |
| Análisis de datos de la etapa 1 y 3 | | | x | x | x | x | | | | | | | | | x | x | x | x | x | | | | | | |
| Análisis de datos de la etapa 2 y 4 | | | | | | | | | x | x | x | x | | | | | | | | x | x | x | x | x | |
| Jornada de discusión con SAU | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | x | | |
| Informes | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | x | x | x | x | x | |

Resultados esperados de las etapas:

En una primera etapa del proyecto, posterior a la primera polinización, se espera contar con información que permita realizar un primer análisis de los resultados de los

tratamientos, así como elementos para determinar estrategias de mejora de los procedimientos, fundamentalmente en lo que refiere a las herramientas geoestadísticas. Al momento de la finalización del segundo ciclo productivo se espera contar con elementos para poder caracterizar el efecto de los distintos tratamientos sobre la polinización.

Ya con los datos de ambas temporadas y en el último tramo del proyecto se realizará el análisis conjunto de ambos años de ensayos y se elaborarán los materiales de difusión científica y técnica.

VIII. Descripción del espacio físico, así como de los equipos y materiales disponibles para la realización del proyecto.

La facultad de agronomía aportará las instalaciones de oficinas, laboratorios y vehículos utilizados durante el proyecto, por su parte, el Laboratorio de Ecología Química aportará sus instalaciones y equipamiento para realizar los ensayos de PER. Para los ensayos en campo se dispondrá de cuadros de manzana 'Cripp's Pink' ubicados en San José.

Los materiales ya disponibles a utilizar serán:

- Polen de manzana 'Red Delicious' producido por la empresa Polenchile, el cual fue adquirido por Frutisur.
- Colmenas de abejas melíferas
- Dispensadores de polen, incluidos en la compra del polen por parte de Frutisur.
- Mezcla sintética de compuestos volátiles de flores de manzana, aportada por el Dr. Farina (IFIBYNE).
- Lupa trinocular NikonSMZ800N.
- Calibre digital manual Mitutoyo Absolute Digimatic 500-171

IX. Estrategia de vinculación y comunicación con la Contraparte durante la realización del proyecto.

En el presente proyecto se contará con la participación de uno de los apicultores miembro de la SAU, propietario de las colmenas que se utilizarán durante las 2 temporadas de los ensayos en campo. La fluidez en la comunicación con la contraparte será determinada por la participación de integrantes de la contraparte en las actividades del proyecto.

Se planificarán reuniones periódicas con la comisión directiva de la SAU, donde se dará cuenta de las actividades realizadas y resultados parciales obtenidos. Está previsto realizar una vez al año jornadas de discusión de los resultados obtenidos en cada periodo, donde serán invitados todos los actores involucrados directamente con el proyecto. Al finalizar los dos ciclos de estudio se realizará una jornada de discusión y

discusión con invitación a los afiliados de la institución (SAU), docentes y estudiantes de la Universidad de la República interesados e investigadores de la temática.

X. Estrategia de difusión y transferencia de los resultados a la contraparte especificando los mecanismos a utilizar.

La SAU, como organización de apicultores, cuenta con estrategias establecidas y en funcionamiento para la comunicación con sus socios. Estas herramientas serán parte fundamental de la estrategia de comunicación al sector apícola. Por su parte, las instancias de trabajo previas del grupo de investigadores de Facultad de Agronomía con los grupos de productores frutícolas como Afrupi, Jumecal y Frutisur generan la posibilidad de la comunicación directa y fluida con los productores lo cual permitirá que la difusión sea amplia.

En el marco del proyecto se prevé la difusión a los productores mediante distintas estrategias. La realización de una jornada de difusión de resultados una vez terminado el último año de evaluación, la publicación de los resultados a través de la página web de las instituciones participantes y una publicación escrita para público general que será presentada para su publicación en un medio de difusión de tecnologías como la revista de INIA u otro similar.

Los resultados obtenidos del proyecto serán también publicados en la comunidad científica por medio de uno o dos artículos a ser publicados en revista/s arbitrada/s.

XI. Resultados esperados, relevancia e impacto de los mismos tanto para el grupo de investigación como para la contraparte y el sector de la sociedad y/o producción.

Los resultados esperados en tanto la optimización de los servicios de polinización tienen gran relevancia tanto para el sector apícola como de producción de cultivos.

Desde el punto de vista de la SAU, la generación y ejecución de proyectos que den respuesta a las necesidades de sus socios, forma parte de los objetivos fundacionales. Revalorizar la importancia de la polinización en los cultivos y contribuir a la profesionalización de los servicios de polinización son sin lugar a dudas parte de estas necesidades. En el sector productivo de frutas y hortalizas, el estudio en profundidad de los procesos de polinización y las estrategias de mejora de los mismos permitirá aumentar las producciones logrando así una reducción de costos por unidad de producto producida.

Por su parte, para la Universidad de la República y los servicios Facultad de Agronomía, Química y Ciencias, fortalecer las líneas de trabajo, contribuir a la formación de sus integrantes y fortalecer los vínculos interdisciplinarios y con el sector productivo, son parte de los objetivos de este proyecto.

En términos de la sociedad en general la mejora de la polinización de cultivos contribuye con el aspecto de seguridad alimentaria tan relevante en términos de la producción de frutas y hortalizas dependientes de la polinización.

Por último y cómo es de esperarse en esta línea de trabajos de investigación, se espera que los resultados aquí obtenidos y las herramientas metodológicas novedosas que serán utilizadas en este estudio sean base para futuras investigaciones y contribuyan a mejorar

la obtención de resultados tanto desde el punto de vista de la investigación como del sector productivo.

XII. Referencias bibliográficas

Abou-Shaara H., 2014: The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. *VeterinariMedicina*, 59, 1-10. <https://doi.org/10.17221/7240-VETMED>

Aizen, M. A., Aguiar, S., Biesmeijer, J. C., Garibaldi, L. A., Inouye, D. W., Jung, C., Martins, D. J., Medel, R., Morales, C. L., Ngo, H., Pauw, A., Paxton, R. J., Sáez, A., & Seymour, C. L., 2019. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global change biology*, 25, 3516–3527. <https://doi.org/10.1111/gcb.14736>

Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M., 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of botany*, 103, 1579–1588. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp076>

Aslan, C. E., Liang, C. T., Galindo, B., Hill, K., Topete, W., 2016. The Role of Honey Bees as Pollinators in Natural Areas. *Natural Areas Journal*. 36, 478-488. <https://doi.org/10.3375/043.036.0414>

Bos, M.M., Veddeler, D., Bogdanski, A.K., Klein, A., Tschamtkke, T., Steffan-Dewenter, I. and Tylianakis, J.M., 2007, CAVEATS TO QUANTIFYING ECOSYSTEM SERVICES: FRUIT ABORTION BLURS BENEFITS FROM CROP POLLINATION. *Ecological Applications*, 17, 1841-1849. <https://doi.org/10.1890/06-1763.1>

Broothaerts, W., Van Nerum, I., Keulemans, J., 2004. Update on and review of the incompatibility (S-) genotypes of apple cultivars. *Horticultural Science* 39, 943-947. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.5.943>

Buschiazzo, D., Díaz, A., 2017. Costo de producción y estudio de punto de equilibrio. In: Seminario de Actualización Técnica en Frutales de Pepita (2017, Las Brujas, Canelones). Trabajos presentados. Montevideo, INIA, 10-14.

Carisio, L., Straffon Díaz, S., Ponso, S., Manino, A., Porporato, M., 2020. Effects of pollinizer density and apple tree position on pollination efficiency in cv. Gala. *Scientia Horticulturae*. 274, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109629>

Dag, A., Stern, R.A., Shafir, S., 2005. Honeybee (*Apis mellifera*) strains differ in apple (*Malus domestica*) pollen foraging preference. *Journal of Apicultural Research*. 44, 15-20. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101140>

De Iacovo, M., Tachini, R., 2018. Determinación de factores que limitan la productividad en cultivos de manzana de alto potencial. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la Republica. Facultad de Agronomía. 65 p.

Degrandi-Hoffman, G., Hoopingarner, R., Klomparens, K., 1986. Influence of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) In-hive Pollen Transfer on Cross-pollination and Fruit Set in Apple. *Environmental Entomology*. 15, 723-725. <https://doi.org/10.1093/ee/15.3.723>

Delaplane, K. S., an der Steen, J., Guzman, E., 2013. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In: Dietemann, V., Ellis J. D., Neumann, P., (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research. 52, 1-12. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>

Delaplane, K. S., Dag, A., Danka, R. G., Freitas, B. M., Garibaldi, L. A., Goodwin, R. M., Hormaza, J. I., 2013 Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*. In: Dietemann, V., Ellis J. D., Neumann, P., (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.12>

Dennis, F.J., 2003. Flowering, pollination and fruit set and development. In: Ferree, D.C. (Ed.), Apples Botany Production and Uses. CAB International, Cambridge. 153–166.

Dobson, H.E., Bergström, G., 2000. The ecology and evolution of Pollen odors. Plant Systematics and Evolution. 222, 63-87. <https://doi.org/10.1007/BF00984096>

Elfving, D. C., Schechter, I., 1993. Fruit Count, Fruit Weight, and Yield Relationships in “Delicious” Apple Trees on Nine Rootstock. HortScience. 28, 793-795. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.28.8.793>

Eyles, A., Close, D. C., Quarrell, S. R., Allen, G. R., Spurr, C. J., Barry, K. M., Whiting, M. D., Gracie, A. J., 2022. Feasibility of Mechanical Pollination in Tree Fruit and Nut Crops: A Review. Agronomy. 12, 1113. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051113>

Felsenberg, J., Gehring, K. B., Antemann, V., & Eisenhardt, D., 2011. Behavioural pharmacology in classical conditioning of the proboscis extension response in honeybees (*Apis mellifera*). Journal of visualized experiments: JoVE. 47, 2282. <https://doi.org/10.3791/2282>

FAO, 2020. Towards sustainable crop pollination services – Measures at field, farm and landscape scales. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca8965en>

FAO, 2022. FAOSTAT database collections [WWW Document].

Farina, W., Arenas, A., Díaz, P., 2013. FORMULATION THAT PROMOTES TARGETED POLLINATION OF MELLIFEROUS BEES TO APPLE CROPS (WIPO (PCT) No. WO2013005200A1). World Intellectual Property Organization. <https://patents.google.com/patent/WO2013005200A1>

Farina, W., Arenas, A., Díaz, P., Susic Martin, C., EstravisBarcala, M.C., 2020. Learning of a Mimic Odor within Beehives Improves Pollination Service Efficiency in a Commercial Crop. Current Biology. 30, 4284-4290. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.018>

Garratt, M. P., Breeze, T. D., Boreux, V., Fountain, M. T., McKerchar, M., Webber, S. M., Coston, D. J., Jenner, N., Dean, R., Westbury, D. B., Biesmeijer, J. C., & Potts, S. G. 2016. Apple Pollination: Demand Depends on Variety and Supply Depends on Pollinator Identity. PloSone, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153889>

Geslin, B., Aizen, M. A., Garcia, N., Pereira, A. J., Vaissière, B., Garibaldi, L. A., 2017. The impact of honey bee colony quality on crop yield and farmers' profit in apples and pears. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 248, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.07.035>

Hagler, J., Mueller, S., Teuber, L., Deynze, A., Martin, J., 2011. A Method for Distinctly Marking Honey Bees, *Apis mellifera*, Originating from Multiple Apiary Locations. *Journal of insect science (Online)*. 11, 143. [dx.doi.org/10.1673/031.011.14301](https://doi.org/10.1673/031.011.14301)

Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R. Dudash, M. R., Johnston, M. O., Mitchell, R. J., Ashman T., 2005. Pollen Limitations of Plant Reproduction: Pattern and Process. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 36, 467-497. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.115320>

Knoll, S., Pinna, W., Varcasia, A., Scala, A., Cappai, M. G., 2020. The honey bee (*Apis mellifera* L., 1758) and the seasonal adaptation of productions. Highlights on summer to winter transition and back to summer metabolic activity. A review. *Livestock Science*. 235. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104011>

Kremen, C., Williams, N.M., Aizen, M.A., Gemmill-Herren, B., LeBuhn, G., Minckley, R., Packer, L., Potts, S.G., Roulston, T., Steffan-Dewenter, I., Vázquez, D.P., Winfree, R., Adams, L., Crone, E.E., Greenleaf, S.S., Keitt, T.H., Klein, A.-M., Regetz, J. and Ricketts, T.H., 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters*, 10, 299-314. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01018.x>

Langridge, D.F., Jenkins, P.T., 1970. The role of honeybees in pollination of apples. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 10, 366–368.

Matsumoto, S., Furusawa, Y., Kitahara, K., Soejima, J., 2003. Partial genomic sequences of S6-, S12-, S13-, S14-, S17-, S19-, and S21-RNase of apple and their allele designations. *Plant Biotechnology*. 20, 323–329. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.323>

MGAP-DIEA, 2021. Anuario Estadístico Agropecuario. Consultado mayo. 2022. Disponible en <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2021/LIBRO%20ANUARIO%2021%20Web.pdf>

MGAP-OPYPA, 2021. Sector apícola: situación y perspectivas. In: Anuario de OPYPA 2021. Consultado mayo. 2022. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/analisis-sectorial-cadenas-productivas/sector-apicola#:~:text=De%20acuerdo%20al%20Registro%20Nacional,la%20cantidad%20de%20colmenas%20por>

Millán, J., Díaz, A., Ackermann, M. N., 2020. Actualización y revisión de la estructura de costos de producción de Horticultura y Fruticultura. *Estudios de Economía Agraria y Ambiental*. 20, 1-61.

Oliver, M. A., Webster, R., 2013. A tutorial guide to geostatistics: Computing and modelling variograms and kriging. *Catena*. 113, 56-69.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.catena.2013.09.006>

Pardo, A., Borges, P. A. V., 2020. Worldwide Importance of Insect Pollination in Apple Orchards: A Review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 293.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106839>

Pérez-Méndez, N., Andersson, G.K.S., Requier, F., Hipólito, J., Aizen, M.A., Morales, C.L., García, N., Gennari, G.P., Garibaldi, L.A., 2020. The economic cost of losing native pollinator species for orchard production. *Journal of Applied Ecology*. 57, 599-608.
<https://doi.org/10.1111/1365-2664.13561>

Pinillos, V., Cuevas, J., 2008. Artificial Pollination in Tree Crop Production. *Horticultural Reviews*. 34, 239-276. <https://doi.org/10.1002/9780470380147.ch4>

Pozo, M.I., Vendeville, J., Kay, C., Wackers, F., 2018. Entomovectoring technology in kiwifruit pollination. *Acta Horticulturae*. 1218, 381-390
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1218.53>

Quinet, M., Mabeluanga, T., Moquet, L., Jacquemart, A., 2016. Introduction of new tools to improve pollination in European pear orchards. *Scientia Horticulturae*. 213, 5-12.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.014>

Ramirez, F., Davenport, T. L., 2013. Apple pollination: A review. *Scientia Horticulturae*. 162, 188-203. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.007>

Peterson, R., Slovin, J., Chen, C., 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*. 1, 66-69
<dx.doi.org/10.4081/pb.2010.e13>

Sáez, A., di Virgilio, A., Tiribelli, F. Geslin, B., 2018. Simulation models to predict pollination success in apple orchards: a useful tool to test management practices. *Apidologie* 49, 551–561. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0582-2>

Santos, E., Mendoza, Y., Díaz, R., Harriet, J., Campa, J., 2009. Valor económico de la polinización realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación. INIA, Serie de Actividades de Difusión N° 568, 25-28.

Santos, E., Mendoza, Y., Invernizzi, C., Baráibar, J., Cabrera, D., Zoppolo, R., Harriet, J., 2015. Dependencia del cultivo de manzana a la polinización entomófila en Uruguay . Importancia de la Abeja melífera en el cuajado de los frutos. INIA. 42, 29-32.

Santos, E., Invernizzi, C., 2018. Comportamiento de pecoreo de las abejas melíferas en manzanos de las variedades Cripps Pink y Red Chief. *Agrociencia Uruguay*. 22, 48-57.
<http://dx.doi.org/10.31285/agro.22.2.11>

Stern, R.A., Eisikowitch, D., Dag, A., 2001. Sequential introduction of honeybee colonies and doubling their density increases cross-pollination, fruit-set and yield in 'Red Delicious'

Apple. Journal of Horticultural science & Biotechnology. 76, 17-23.
<https://doi.org/10.1080/14620316.2001.11511320>

Stern, R.A., Goldway, M., Zisovich, A.H., Shafir, S., Dag, A., 2004. Sequential introduction of honeybee colonies increase cross-pollination, fruit-set and yield of 'Spadona' pear (*Pyrus communis* L.). Journal of Horticultural science & Biotechnology. 79, 652-658.
<https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511821>

Tamburini, G., Bommarco, R., Kleijn, D., van der Putten, W. H., Marini, L., 2019. Pollination contribution to crop yield is often context-dependent: A review of experimental evidence. Agriculture, Ecosystems & Environment. 280, 16-23.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.04.022>

Teodorescu, G., Moise, V., Cosac, A. C., 2016. Spatial Variation in Blooming and Yield in an Apple Orchard, in Romania. Annals "Valahia" University of Targoviste - Agriculture. 10, 1-6. [dx.doi.org/10.1515/agr-2016-0001](https://doi.org/10.1515/agr-2016-0001)

Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U., Schnitzler, J. P., 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. The Plant Journal. 45, 540-560.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02612.x>

Vicens, N., Bosch, J., 2000a. Weather-Dependent Pollinator Activity in an Apple Orchard, with Special Reference to *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae and Apidae). Environmental Entomology. 29, 413-420. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.3.413>

Vicens, N., Bosch, J., 2000b. Pollinating Efficacy of *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae, Apidae) on 'Red Delicious' Apple. Environmental Entomology. 29, 235-240. <https://doi.org/10.1093/ee/29.2.235>

Watanabe, M.E., 1994. Pollination worries rise as honeybees decline. Science, 265, 1170.
<https://doi.org/10.1126/science.265.5176.1170>

Wünsche, J.N., Ferguson, I.B., 2005. Crop Load Interactions in Apple ABBREVIATIONS. Horticultural Reviews. 31, 231–290.