

Títol del treball: *Pheidole pallidula* como posible vector de polinización asistida en cultivos de calabacín (*Cucurbita pepo* L.)

Estudiant: Andrés Acuña Perandrés

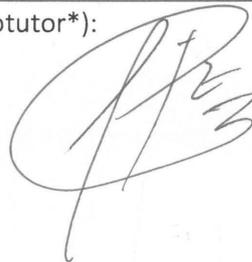
Grau en Biologia

Correu electrònic: andrew25041994@gmail.com

Tutor: Crisanto Gómez López

Empresa / institució: Facultat de Ciències, Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):



Nom del tutor: Crisanto Gómez López

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Facultat de Ciències, Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): crisanto.gomez@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:



***Pheidole pallidula* como posible vector de
polinización asistida en cultivos de calabacín
(*Cucurbita pepo* L.)**

Andrés Acuña Perandrés

Tutor: Crisanto Gómez López

TFG – Grau en Biologia

Setembre de 2016

Resumen

Los cultivos protegidos de calabacín suponen cada vez más, una fuente de ingresos de destacada importancia dentro del sector agrícola. No obstante, el cultivo de esta hortaliza cuenta con una problemática asociada a la polinización, atribuida a la falta de polinizadores, que hace de este, un cultivo mucho menos productivo. Hasta la fecha, se ha optado por el uso de fitohormonas que inducen el fruto, pero estos métodos son rechazados por los consumidores, dado que este producto perdura en el fruto incluso cuando este se encuentra en el mercado. Este estudio intenta evaluar la especie de hormiga *Pheidole pallidula* (Nylander, 1849) como posible vector de polinización en cultivos de calabacín, para así evitar el uso de otras técnicas más costosas y/o menos respetuosas con el medio ambiente. Para ello se realiza un recuento de los granos de polen que portan las hormigas salientes de la flor masculina y los de las entrantes en la flor femenina, durante un periodo de tiempo de 5 minutos. Además, se lleva a cabo un experimento de exclusión sobre tres grupos de plantas (G1: Plantas con *P.pallidula*, G2: Plantas con *Lasius niger* (Linnaeus., 1758) y G3: Plantas sin hormigas “control”), con el objetivo de comparar el cuajado de frutos en presencia de una hormiga u otra, además de la ausencia de estas. Los resultados obtenidos, demuestran la capacidad de *P.pallidula* de transportar granos de polen entre las flores de ambos sexos (1264 granos/hora), así como la efectividad de esta en el cuajado del fruto (frecuencia de cuajado 0.73) respecto al grupo control (0.56). No obstante, esta hormiga experimenta una gran pérdida de carga polínica que se ve compensada por el elevado número de visitas (115.6 ± 12.11 ind/5min). Además, se ha constatado que *L.niger* resulta perjudicial para las plantas de calabacín así como para el cuajado de sus frutos (frecuencia de cuajado 0.28). Finalmente, se concluye que *P.pallidula* resulta un vector de polinización interesante, que hasta ahora no se había tenido en cuenta, y que podría ser objeto de estudio en trabajos posteriores que evaluaran su efectividad bajo cultivo protegido.

Resum

Els cultius protegits de carbassó suposen cada vegada més, una font d'ingressos de destacada importància dins del sector agrícola. No obstant, el cultiu d'aquesta hortalissa posseeix una problemàtica associada a la pol·linització, atribuïda a la falta de pol·linitzadors, que fa d'aquest, un cultiu molt menys productiu. Fins ara, s'ha optat per l'ús de fitohormones que indueixen el fruit, però aquests mètodes son rebutjats pels consumidors, donat que aquest producte roman present al fruit, fins i tot quan aquest es troba al mercat. Aquest estudi intenta avaluar l'espècie de formiga *Pheidole pallidula* (Nylander, 1849) com a possible vector de pol·linització assistida en cultius de carbassó, per així evitar l'ús d'altres tècniques més costoses i/o menys respectuoses amb el medi ambient. Per això, es duu a terme el recompte dels grans de pol·len que porten les formigues sortints de la flor masculina y els de les entrants a les flors femenines, durant un període de temps de 5 minuts. A més a més, es realitza un experiment d'exclusió sobre tres grups de plantes (G1: Plantes amb *P.pallidula*, G2: Plantes amb *Lasius niger* (Linnaeus., 1758) y G3: Plantes sense formigues "control"), amb l'objectiu de comparar el quallat del fruit en presencia d'una formiga o una altra, així com l'absència d'aquestes. Els resultats obtinguts, demostren la capacitat de *P.pallidula* de transportar grans de pol·len entre les flors d'ambdós sexes (1264 grans / hora), així com l'efectivitat d'aquesta en el quallat del fruit (freqüència de quallat 0.73) respecte al grup control (0.56) . Tanmateix, aquesta formiga experimenta una gran pèrdua de càrrega pol·línica que es veu compensada per l'elevat nombre de visites (115.6 ± 12.11 ind / 5 minuts) . A més, s'ha constatat que *L.niger* resulta perjudicial per a les plantes de carbassó així com per al quallat dels seus fruits (freqüència de quallat 0.28) . Finalment , es conclou que *P.pallidula* resulta un vector de pol·linització interessant , que fins ara no s'havia tingut en compte , i que podria ser objecte d'estudi en treballs posteriors que avaluessin la seva efectivitat sota cultiu protegit.

Summary

Zucchini protected crops are increasing their relevance in the agricultural sector. However, the cultivation of this vegetable has a problem associated with pollination, attributed to the lack of pollinators, which makes a much less productive crops. To date, farmers use fithormones that inducing the fruit, but consumers reject these methods, since this product remains in the fruit even when it is on the market. This study attempts to evaluate the ant species *Pheidole pallidula* (Nylander, 1849) as a possible vector of pollination in crops of zucchini, to avoid the use of other more costly and / or less environmentally friendly techniques. This requires a count of pollen grains carrying the outgoing ants of male flowers and the incoming ants of the female flower. This count is performed over a period of time of 5 minutes. In addition, it conducted an exclusion experiment on three groups of plants (G1: Plants with *P.pallidula*, G2: Plants with *Lasius niger* (Linnaeus, 1758) and G3. Plants without ants "control"), with the aim to compare the fruit set in presence of an ant or another, and the absence of both. The results obtained show the capacity to transport *P.pallidula* grains of pollen between flowers of both sexes (1264 grains / hour), and the effectiveness of this in the fruit setting (frequency of curdled 0.73) than the control group (0.56). However, this ant is experiencing a great loss of pollen load that is offset by the high number of visits (115.6 ± 12.11 ind / 5 min). In addition, it has been found that *L.niger* is harmful to plants for zucchini and fruit set of fruit (fruit setting rate 0.28). Finally, we can conclude that *P.pallidula* is an interesting pollination vector, which until now it has not been taken into account, and it could be studied, in later works that assess their effectiveness under protected cultivation.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Introducción | 2 |
| - Importancia de los cultivos hortícolas | 2 |
| - La polinización en los cultivos | 4 |
| - Importancia de los cultivos de calabacín (<i>Cucurbita pepo</i>) | 5 |
| - Problemática en la polinización | 7 |
| - Hormigas como vectores de polinización | 8 |
| - <i>Pheidole pallidula</i> como vector de polinización | 9 |
| Objetivos del Estudio | 10 |
| Material y Métodos | 11 |
| - Zona de estudio | 11 |
| - Diseño experimental | 12 |
| <i>Capacidad transportadora de P.pallidula</i> | 13 |
| <i>Experimento de exclusión</i> | 13 |
| Resultados | 16 |
| - Capacidad transportadora de <i>P.pallidula</i> | 16 |
| - Experimento de exclusión | 17 |
| <i>Experimento de exclusión en plantas con P.pallidula (G.1)</i> | 17 |
| <i>Experimento de exclusión en plantas con L.niger (G.2)</i> | 18 |
| <i>Experimento de exclusión en plantas sin hormigas (G.3)</i> | 19 |
| <i>Comparación de los 3 grupos de plantas (G1, G2 y G3)</i> | 20 |
| Discusión | 21 |
| Ética y Sostenibilidad | 23 |
| Conclusiones..... | 24 |
| Bibliografía | 24 |

Introducción

Importancia de los cultivos hortícolas

El sector hortícola europeo, es uno de los más importantes a nivel mundial, encabezando el segundo puesto a nivel de producción en 2010, con un 68,50% de las 93.805.115 toneladas producidas mundialmente. No obstante, se sitúa en el tercer puesto en lo que respecta al total de hectáreas cultivadas, con un 56,43% de las 4.228.192 ha cultivadas a nivel mundial (Tabla.1). Concretamente, los países del sur son los mayores productores y exportadores. España ocupa el primer puesto con un 22,10% y Italia el segundo lugar con 19,74% de la producción total europea. España por lo tanto, juega un papel fundamental en la producción de hortalizas a nivel europeo y mundial (FAOSTAT, 2012).

Tabla 1: Superficie cultivada (ha) y producción (t) de hortalizas, a nivel mundial. (fuente: FAOSTAT, 2012).

| Continentes | Superficie total (ha) | | Producción total (t) | |
|--------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| | 2001 | 2010 | 2001 | 2010 |
| Asia | 33.675.311 | 39.608.251 | 583.730.215 | 790.733.563 |
| África | 5.381.012 | 6.766.147 | 49.231.285 | 68.295.437 |
| Europa | 4.734.300 | 4.228.192 | 92.542.032 | 93.805.115 |
| América | 3.855.299 | 3.832.937 | 75.706.434 | 79.962.438 |
| Mundo | 47.827.402 | 54.593.391 | 804.863.341 | 1.036.315.615 |

Todos estos incrementos en la producción son debidos en gran parte, a que a lo largo de los años los horticultores han optado por el uso de protecciones, para intentar evitar todos aquellos factores que puedan afectar negativamente al desarrollo de sus cultivos y potenciar aquellos que los favorecen para satisfacer todas las necesidades de este, en cualquier época del año y sobre todo cuando el cultivo no es posible al aire libre. El uso de pantallas protectoras se ha llevado a cabo a lo largo de los siglos, utilizando diversos materiales. Sin embargo, la posterior introducción de las láminas de plástico fue el hecho destacable que produjo la gran expansión de la superficie de invernaderos en Japón y China, principalmente y en los países de Europa (España e Italia) (Castilla, 1994).

Tabla 2: Producción (t), valor de la producción (miles de €), y valor económico generado por la actividad de los polinizadores (miles de €) en las principales hortalizas de la provincia de Almería. Año 2002 (Guerra-Sanz et al., 2005).

| Especie | Producción (t) | Valor de la producción (Miles de €) | Valor generado por polinizadores (Miles de €) |
|----------------|-----------------------|--|--|
| Sandía | 200.210 | 54.057 | 21.622,8 |
| Melón | 163.024 | 84.772 | 50.863,2 |
| Calabacín | 229.352 | 144.492 | 86.695,2 |
| Pepino | 262.200 | 167.808 | 16.780,8 |
| Berenjena | 70.200 | 35.100 | 21.060 |
| Tomate | 806.736 | 572.783 | 343.669,8 |
| Pimiento | 542.925 | 352.901 | 70.580,2 |
| TOTAL | 2.339.617 | 1.482.730 | 611.980,17 |

Actualmente, la superficie agrícola europea en invernadero se reduce a los países del mediterráneo y a la producción en invernadero de cristal llevada a cabo en los Países Bajos (3.237 ha) (Cantliffe y Vansickle, 2003). El número de cultivos que pueden realizarse bajo plástico en la cuenca mediterránea es reducido. El tomate es el primero en importancia; seguido, a gran distancia, del pimiento, el melón, el calabacín y, con posterioridad, de la berenjena, el pepino y la sandía (FAO, 2002).

En los últimos 20 años, la superficie española de cultivo en invernadero se ha incrementado, progresivamente, respecto al resto de técnicas de cultivo. Esto es debido a que los agricultores han obtenido mayores producciones y unos elevados beneficios a causa de la exportación de hortalizas recolectadas en invierno (Castilla, 1994; MAGRAMA, 2014).

La elevada demanda de hortalizas frescas va asociada a su vez, con unas elevadas exigencias de calidad, seguridad alimentaria y de métodos de cultivo respetuosos con el medio ambiente. Y es, en este último campo, donde la mejora de la polinización de los cultivos y el uso de organismos de control biológico, juegan un papel clave. Además, hay todo un sector empresarial en auge (producción de fauna auxiliar) que se encuentra ligado a todo este conjunto de técnicas agrícolas sostenibles.

La polinización en los cultivos

La polinización es el proceso de transferencia del polen, desde las estructuras reproductivas masculinas hasta los estigmas receptivos de la flor. La polinización se da en las plantas que tienen reproducción sexual, siendo un proceso previo y no equivalente a la fertilización (Kirk, 2005). Exceptuando aquellas especies que realizan el proceso de polinización ellas mismas y las especies partenocárpicas, que son capaces de producir frutos sin necesidad de llevar a cabo la polinización, el resto de especies, requieren la intervención de un polinizador (vector), capaz de transportar los granos de polen, dando como resultado una producción óptima de frutos, tanto en calidad como en cantidad (Traveset, 1999).

Son muchos los vectores que pueden intervenir en la polinización, clasificándose en dos grupos; biótico, mediada por animales (zoofilia) pero sobre todo por insectos (entomofilia) y abióticos, mediante el viento (anemócora) y el agua. Un 75% del total de especies cultivadas para el consumo humano, se benefician en mayor o menor medida de la polinización animal, siendo la polinización por insectos la que juega un papel más relevante, tanto en cultivos protegidos como al aire libre (Tabla 2) (Traveset, 1999; Klein *et al.*, 2007; Rundlöf y Smith, 2011). La abeja melífera (*Apis mellifera*) suele considerarse uno de los polinizadores más eficientes debido a su gran actividad durante el día y el gran número de visitas que realiza (Bosh, 2005). No obstante, hay que tener en cuenta que abejorros y otros insectos (dípteros, lepidópteros y coleópteros) también llevan a cabo una gran parte de la polinización en los cultivos (Bosh, 2005; FAO, 2008; Rundlöf y Smith, 2011).

Las producciones hortícolas dependen en gran medida de una adecuada polinización, ya que si esta no se lleva a cabo de forma eficiente, da lugar a una baja productividad en muchos cultivos (Shivanna y Sawney, 1997; Pinillos y Cuevas, 2008). No obstante, actualmente todavía no se ha estudiado el grado de necesidad real de los polinizadores en la mayoría de cultivos. A pesar de ello, si se han identificado algunos que dependen totalmente de la polinización animal para dar fruto (calabaza, calabacín, sandía, melón...) mientras que otros son capaces de

producir el 90% de las semillas sin necesidad de ésta (olivo, pimiento, uva...) (Klein *et al.*, 2007).

Los cultivos hortícolas protegidos, igual que el resto de cultivos, requieren de una polinización eficiente. Sin embargo, la propia cobertura que les protege, también impide el acceso a los vectores encargados de dicha polinización. Como consecuencia, se producen déficits de polinización que desembocan en pérdidas de calidad y cantidad de los frutos. Con el objetivo de superar estas barreras reproductivas, se desarrolló la polinización asistida o artificial. La cual se define como la aplicación de polen suplementario compatible, previamente recolectado por medios biológicos o mecánicos. Dicha aplicación artificial se considera como una herramienta muy útil que, en la mayoría de los casos, conduce a un aumento de la producción y a una mejora de la calidad del fruto (Roldán-Serrano, 2014).

La práctica de la polinización asistida ha desplazado a muchas otras técnicas más laboriosas i que suponían un mayor coste económico (polinización manual, por viento o por vibración) (Guerra-Sanz, 2004). Este auge en el uso de insectos como vectores de polinización en cultivos protegidos, es debido a que los estudios realizados con la abeja melífera (Kubisová y Haslbachová, 1991; Ruijter *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 2005), sírfidos (Jarlan *et al.*, 1997) y otras abejas (Kristjansson y Rasmussen, 1991; Monzón *et al.*, 2004), han demostrado que la presencia de cualquier polinizador, siempre favorece la calidad y cantidad de los frutos cultivados. Actualmente, esto ha llevado a la comercialización de muchos insectos para su utilización en cultivos protegidos.

Importancia de los cultivos de calabacín (*Cucurbita pepo* L., 1753)

La planta del calabacín (*Cucurbita pepo*) tiene su origen en América, concretamente en las zonas tropicales próximas a México. Se trata de una planta perteneciente a la familia de las cucurbitáceas, monoica (Webb y Lloyd, 1986) (Figura 1), anual y de crecimiento indeterminado. Presenta flores solitarias, axilares i de forma acampanada. Una de sus características de mayor importancia desde el punto de vista de la polinización, es la gran cantidad de néctar que poseen sus flores, siendo mayor en las femeninas.

Estas, son más grandes que las masculinas, pudiendo albergar un mayor número de polinizadores en su interior (Nepi, 2005). También cabe destacar que la antesis floral, abarca un periodo de tiempo muy breve, llegando como máximo a las 6 horas. Las flores se abren con las primeras luces de la mañana y se cierran, antes de las horas más calurosas del día para no volver a abrirse jamás (7-12h) (Stapleton *et al.*, 2000).

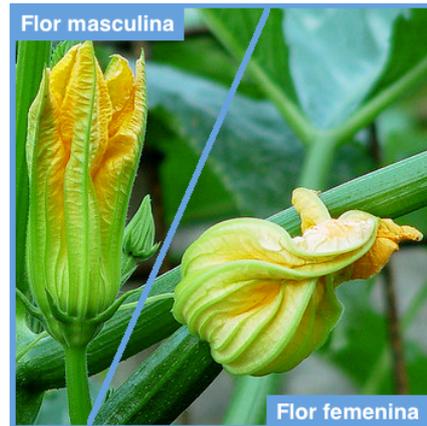


Figura 1: Imagen de las flores de ambos sexos de una planta de calabacín.

Autor: Andrés Acuña

La principal aplicación del calabacín se encuentra en el ámbito gastronómico, siendo su fruto inmaduro la parte más cotizada en el mercado. No obstante, cada vez más, tanto el fruto como las flores de esta planta, están adquiriendo un papel más relevante dentro de la cocina mediterránea. Hasta hace muy poco, el calabacín era considerado una planta de cultivo secundario, que únicamente se plantaba asociado a otro cultivo principal como el tomate o el pimiento (Reche, 1997). Actualmente, como consecuencia de los buenos precios de venta, la reducción de los costes del cultivo y la elevada tasa de recolección (que puede llegar a ser diaria), ha propiciado que se considere a esta hortaliza como un cultivo muy rentable y pase a ser considerado como un cultivo principal. Esto ha llevado al aumento de las hectáreas dedicadas al cultivo de esta hortaliza (Gráfico 1). Este auge del consumo de calabacín, ha provocado también, una respuesta por parte de los mercados, haciendo aumentar el precio progresivamente a lo largo de los últimos años (Gráfico 2).

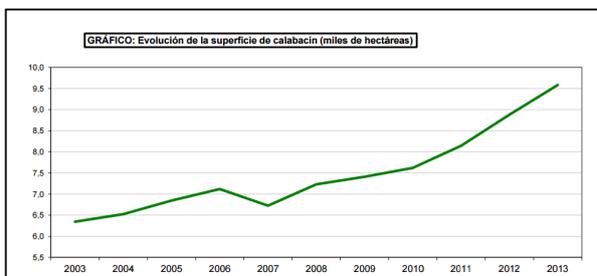


Gráfico 1: Evolución de la superficie dedicada al cultivo de calabacín (miles de hectáreas).

Fuente: MAGRAMA 2014

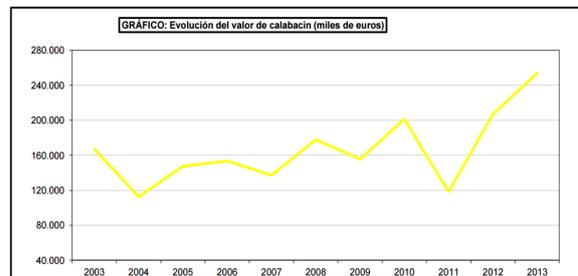


Gráfico 2: Evolución del valor monetario del calabacín (miles de euros).

Fuente: MAGRAMA 2014

La producción de esta hortaliza en la Península, viene liderada por Andalucía con 412.477 toneladas seguida de Catalunya (12.593t) en el año 2013 (MAGRAMA, 2014). La producción de calabacín en estas dos comunidades se está viendo incrementada en los últimos años, debido a la elevada demanda de los consumidores, suponiendo así, un importante beneficio económico para los agricultores de estas dos regiones, que cada año emplean más recursos y avances para incrementar sus beneficios. No obstante, con la elevada demanda también se han incrementado los requisitos de los consumidores, que cada vez más, requieren hortalizas producidas de forma respetuosa con el medio ambiente. E aquí la importancia de encontrar vectores biológicos de polinización que sirvan para satisfacer estos requisitos.

Problemática en la polinización

El cultivo del calabacín en invernadero, cuenta con una gran problemática asociada en lo que respecta a la polinización. Esto conlleva un deficiente cuajado de los frutos que repercute económicamente en los agricultores. La causa de este problema se puede atribuir a dos factores. En primer lugar, a la no coincidencia del desarrollo y apertura de las flores en una misma planta, siendo las flores masculinas las primeras en abrirse y posteriormente las femeninas (Nepi, 2005). En segundo lugar, se encuentra la problemática asociada a los vectores de polinización, ya que en su lugar de origen, esta planta posee como vectores específicos, abejas solitarias de gran tamaño (Krombein *et al.*, 1979), ausentes en la Península.

Debido a estos problemas, y teniendo en cuenta que la planta de calabacín es capaz de producir frutos partenocárpicos, los agricultores en estos últimos años, han optado por el uso de fitohormonas. El uso de estas, provoca malformaciones en el fruto y un envejecimiento muy rápido de la planta, causado por una fructificación en masa (Rylski y Aloni, 1991; Robinson y Reiners, 1999). Otro factor de gran importancia es el cumplimiento de los plazos de seguridad de persistencia del producto en fruto que, generalmente, superan el tiempo de recolección, ya que esta se lleva a cabo de forma diaria, por lo que, cuando el calabacín llega al consumidor, aún quedan restos del producto.

Con el objetivo de solucionar esta problemática de forma sostenible y respetuosa con el medio ambiente, se han planteado el uso de algunos vectores biológicos como *Bombus terrestris* o *Apis mellifera*, siendo el primero el más utilizado. No obstante, los estudios comparativos entre este abejorro y las fitohormonas no acaban de proporcionar resultados del todo satisfactorios en lo que respecta a la uniformidad del fruto y otros aspectos de calidad (Gázquez *et al.*, 2004). Debido a esto, es de vital importancia el estudio y evaluación de nuevos vectores biológicos de polinización, que permitan la obtención de una correcta fructificación.

Hormigas como vectores de polinización

Des de hace muchos años, la comunidad científica ha tenido serias reticencias en lo que respecta a considerar a las hormigas como vectores de polinización eficientes. No obstante, algunos autores han descrito relaciones mutualistas muy especializadas entre plantas y hormigas, como por ejemplo la dispersión de semillas a partir del eleosoma (estructura nutritiva que se encuentra en el exterior de algunas semillas) (Hanzawa *et al.*, 1988; Giladi, 2006). Además también se han descrito estrechos mutualismos en el campo de la polinización, llegando a representar el 100% de las visitas a las flores (Cursach y Rita, 2012a; Zhongjian *et al.*, 2008). Esta reticencia, se debe a un conjunto de características propias de las hormigas, que las ha posicionado como vectores de polinización poco eficientes. Entre estas, cabe destacar el tamaño, que para muchos autores ha supuesto un obstáculo, al impedir un correcto transporte de los granos de polen (Armstrong, 1979; Inouye, 1980). En contra partida, estudios actuales demuestran que hormigas de pequeño tamaño (hasta 3mm) son capaces de llevar a cabo una correcta polinización (de Vega *et al.*, 2009).

Otra de las características morfológicas que algunos autores han considerado una barrera, es el integumento suave que impide que los granos de polen se adhieran a su cuerpo (Armstrong, 1979). Pero de nuevo, estudios recientes han demostrado que no todas las hormigas presentan un integumento liso, en el que la adherencia del polen es muy baja, sino que muchas especies poseen pelos, rugosidades y

ornamentaciones que hacen posible la perfecta adherencia de los granos de polen (de Vega y Herrera, 2012; Schielst y Glaser, 2012). El hecho de que las hormigas lleven a cabo una limpieza de su cuerpo con asiduidad, ha sido descrito como otro factor en contra de su actividad polinizadora (Faegri y van der Pijl 1979). No obstante, otros polinizadores considerados muy efectivos, como las abejas, también limpian sus cuerpos con frecuencia (Holmquist *et al.* 2012).

Por todas estas características, las hormigas han sido excluidas del mundo de la polinización por parte de la comunidad científica. Pero tal y como han demostrado el conjunto de autores actuales, no todas las especies de hormigas presentan esos rasgos que las hacen malas polinizadoras. Y es por eso, que no se puede englobar a todas las especies de hormigas en lo que respecta a la polinización de las plantas.

***Pheidole pallidula* (Nylander, 1849) como vector de polinización**

Se trata de una especie mediterránea, muy abundante en la Península Ibérica, de hábitos omnívoros, generalista y oportunista. Se alimenta de insectos muertos, semillas, frutas y en muchas ocasiones de néctar. En lo que respecta a la morfología, presenta un integumento liso y brillante, pero todo este, se encuentra recubierto por quetas (vellosidades) largas y erectas (Detrain, 1990). Estas, permiten la adherencia de los granos de polen tal y como han descrito muchos autores (Cursach y Rita, 2012a; Cursach y Rita, 2012b).

Por lo tanto, dada su amplia distribución dentro de la Península y concretamente su gran abundancia en las zonas donde se concentra el cultivo protegido de calabacín (Almería y Maresme)(Figura 2), juntamente con la presencia de las quetas y su interés por el néctar de las flores, hacen de esta hormiga, un posible vector de polinización eficiente en los cultivos de calabacín.

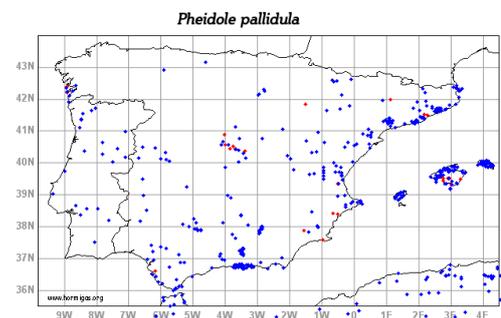


Figura 2: Distribución de *Pheidole pallidula* en la Península Ibérica.

Fuente: *Hormigas.org*

Objectives

❖ **Determine the capacity of *Pheidole pallidula* to transport pollen grains from male flower to female on zucchini plants and pollen load loss associated.**

- **Hypothesis:** Expected that due to the presence of numerous long and erect setae on their integument, *P.pallidula* be capable to transport the pollinic load necessary to carry out the pollination of zucchini plants. With respect to the loss of pollinic load is expected to be substantial due to the cleaning that the ants carrying out, but is not sufficient to prevent pollination.

❖ **Compare fruit set among plants with *Pheidole pallidula*, plants with *Lasius niger* (Linnaeus, 1758) and plants without the presence of ants.**

- **Hypothesis:** Expected that due to the in above hypothesis, plants with *P.pallidula* present a greater fruit set that the crop without ants. In addition, it is also expected that due to the behaviour that demonstrates *L.niger* with the zucchini flowers, plants with this ant, carry out a smaller fruit set than the rest.

Material y Métodos

Zona de estudio

La parcela seleccionada para este estudio se encuentra en el municipio de La Roca del Vallès, localizado en la comarca del Vallès Oriental (Provincia de Barcelona)(Figura 3). Se trata de una región con características de temperatura y humedad muy similares a las que presenta la comarca del Maresme, núcleo del cultivo protegido de calabacín en Catalunya.

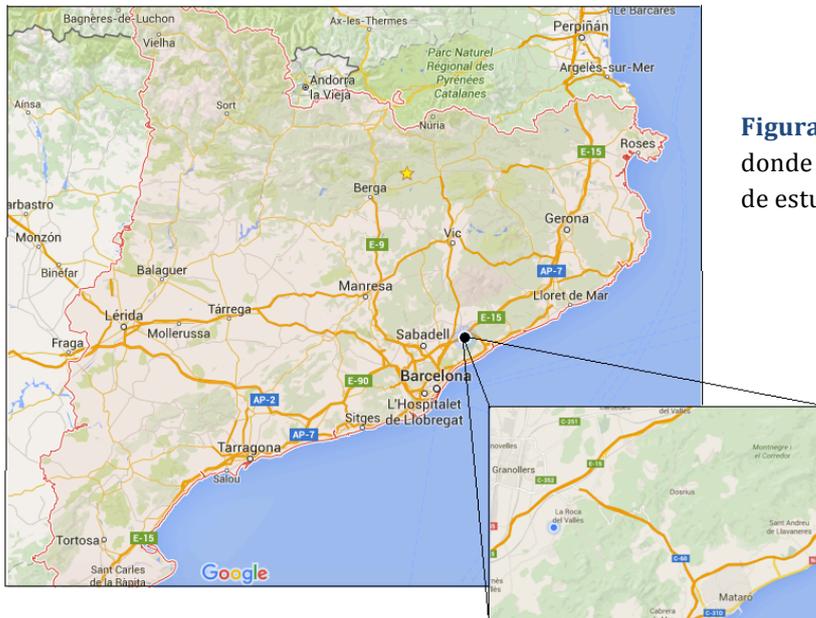


Figura 3: Mapa de la ubicación donde se encuentra la parcela de estudio.

La parcela de estudio, cuenta con 450 m² repartidos en su mayoría en tres partes, correspondientes a los 3 grupos de plantas sobre los cuales se lleva a cabo el estudio (Figura 4). En primer lugar, plantas de calabacín que presentan una colonia de *P. pallidula* cercana (G1). En segundo lugar, un grupo de plantas que presenta una colonia de *Lasius niger* (G2) y finalmente, un grupo control que no presenta ninguna colonia de hormigas (G3).

Diseño experimental

La metodología de este estudio, se compone principalmente de 2 experimentos, a partir de los cuales, se intentan obtener datos que vislumbren la capacidad de *Pheidole pallidula* como vector de polinización. El primer experimento consta de un recuento exhaustivo de los granos de polen que las hormigas transportan adheridos a su integumento. Este recuento se lleva a cabo en las hormigas salientes de las flores masculinas y las entrantes en las flores femeninas. De esta manera, también se podrán obtener datos sobre la pérdida de carga polínica en *P. pallidula*.

En segundo lugar, se ha realizado un protocolo de exclusión, formado por 4 procedimientos, en los cuales se aísla a las diferentes categorías de polinizadores (aéreos y terrestres). En el primer procedimiento se excluye a los vectores de polinización terrestres, en el segundo, a los aéreos, en el tercero a ambos (aéreos+terrestres) y finalmente un grupo control en el cual no se ha llevado a cabo ninguna exclusión. Además, paralelamente a estos, se ha realizado un quinto procedimiento en el que las flores se polinizaron manualmente. Los 4 procedimientos que componen el protocolo de exclusión, juntamente con la polinización manual, se han llevado a cabo en los 3 grupos diferentes de plantas.

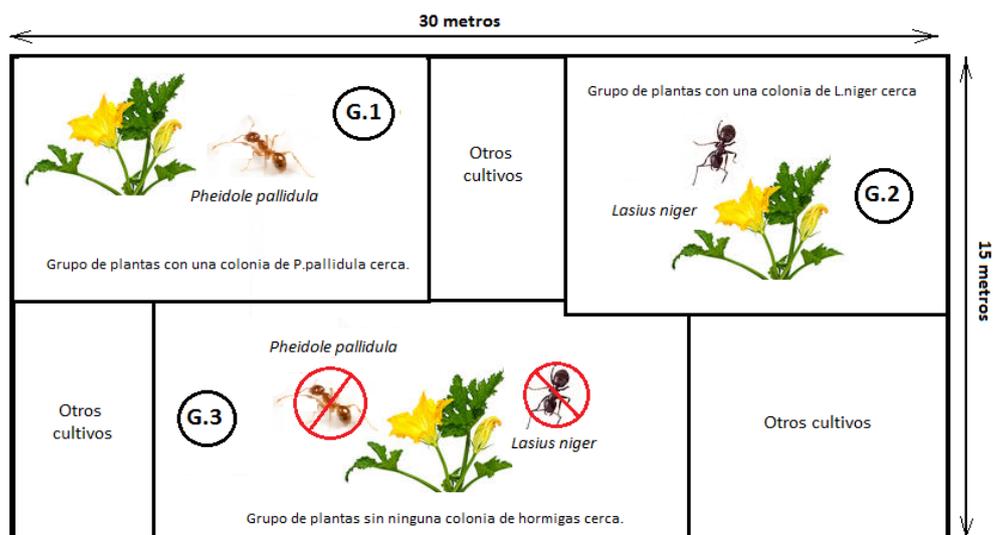


Figura 4: Representación esquemática de la parcela donde se encuentran los 3 grupos de plantas de este estudio (G1, G2 y G3).

Fuente: Elaboración propia (Andrés Acuña)

- Capacidad transportadora de *P.pallidula*

Con este experimento se pretende determinar el nº medio de granos de polen, que las hormigas de esta especie son capaces de transportar al salir de la flor masculina y el nº medio de granos de polen que transporta cada individuo al entrar a la flor femenina. Además, también se obtendrá la pérdida de carga polínica que experimenta la hormiga en el desplazamiento entre las flores de ambos sexos.

Para ello, se han escogido un total de 10 flores. Las 5 primeras son flores masculinas, de las cuales se recogerán todos los individuos salientes de éstas durante un periodo de tiempo de 5 minutos. Se limita el tiempo de recogida debido a que las hormigas llevan a cabo una constante entrada y salida de la flor. La recogida de los individuos se realiza a las 10h de la mañana momento en el que las flores de calabacín se encuentran en su máxima apertura y el polen en su punto de madurez idóneo para la polinización (Nepi, 2005). Todas las hormigas recogidas, se observan bajo la lupa binocular con el objetivo de determinar la carga polínica que presenta cada una.

En segundo lugar, se han escogido 5 flores femeninas, en las cuales se ha llevado a cabo el procedimiento mencionado anteriormente. No obstante, los individuos que se han recogido han sido los entrantes en la flor y no los salientes como en las flores masculinas. De esta manera se pretende determinar la pérdida polínica que hay durante el desplazamiento de las hormigas entre las flores de ambos sexos.

- Experimento de exclusión

El objetivo de este procedimiento se centra en la obtención de datos relativos al cuajado del fruto (calabacín), por parte de plantas que presentan hormigas diariamente en sus flores y tallos. De esta manera y mediante el experimento de exclusión, es posible comparar la capacidad polinizadora de estas especies de hormigas entre ellas y respecto al grupo control (ausencia de hormigas), a la vez que se estudia la importancia de los polinizadores aéreos en el cuajado del fruto.

Para obtener estos datos, se han escogido 3 grupos de plantas los cuales se diferencian por la presencia de una especie de hormiga u otra, o bien la ausencia de hormigas. Todas las plantas del cultivo pertenecen a la misma variedad de calabacín (zucchini), presentan el mismo estadio de desarrollo, irradiación solar y perciben igual cantidad de agua y abono. Los grupos formados en la parcela están constituidos por 5 plantas de calabacín y en el caso de G1 y G2, expuestos a *P.pallidula* y *L.niger* respectivamente, presentan una colonia de hormigas de cierta madurez (mas de 2 años) a menos de 1 metro del conjunto de plantas.

Aunque se haya distinguido entre tres grupos de plantas, el procedimiento de exclusión de polinizadores llevado a cabo en cada grupo, es el mismo. Este procedimiento cuenta con 4 categorías de exclusión diferentes, además de la polinización manual. En cada uno de estos grupos se han escogido un total de 75 flores femeninas, repartidas en grupos de 15 para cada categoría (60 para los 4 procedimientos de exclusión y 15 para la polinización manual). Las categorías de exclusión que se han formado son las siguientes:

Sin exclusión (control): Con el objetivo de obtener datos que sirvan para comparar los resultados obtenidos en el resto de categorías, se lleva a cabo la no exclusión de polinizadores . Este grupo control, aportara datos sobre el cuajado de los frutos en plantas que presentan hormigas y polinizadores aéreos (G1 y G2), así como sobre el cuajado natural sin la presencia de ninguna especie de hormiga (G3).

Exclusión de polinizadores terrestres: En esta categoría, se aísla a la flor, de los polinizadores que puedan acceder a través de su base. Para esto, se dispone un fina tira de substancia adhesiva en el pedúnculo de la flor y debido en su mayoría al olor, los vectores terrestres retroceden (Figura 5, A). De esta manera se obtendrán valores del cuajado únicamente para polinizadores voladores.

Exclusión de polinizadores aéreos: En esta categoría, se aísla a la flor, de los polinizadores que puedan acceder vía aérea. Para esto, se lleva acabo la construcción de una estructura cónica, echa de malla plástica y con una luz de 2

mm. Esta estructura se dispone de tal manera que envuelva la totalidad de la flor e impida la entrada de vectores voladores (Figura 5, B). De esta manera se obtendrán valores del cuajado únicamente para polinizadores terrestres, es decir, en su mayoría las hormigas que estén presentes en los grupos G1 y G2.

Doble exclusión (aéreos+terrestres): En esta última categoría, se realiza un aislamiento total de la flor femenina que servirá como grupo de control negativo. Para llevar a cabo este aislamiento absoluto se aplican las dos técnicas anteriormente expuestas (malla+adhesivo). Se espera que como resultado de esta exclusión, ninguno de los frutos llegue a desarrollarse, ya que se niega totalmente el acceso a los polinizadores.

Polinización manual: Finalmente se ha realizado una polinización manual con la ayuda de un pincel, con el objetivo de obtener datos del cuajado del fruto mediante esta técnica que todavía sigue siendo muy utilizada entre muchos agricultores. Y de esta manera, poderlos comparar con el cuajado obtenido por los vectores biológicos de polinización.



Figura 5, (A): Exclusión de polinizadores terrestres mediante una sustancia adhesiva. **(B):** Exclusión de polinizadores Voladores mediante una malla plástica.

Autor: Andrés Acuña

Resultados

Capacidad transportadora de *P.pallidula*

En primer lugar, se observa que el análisis de varianza (ANOVA), elaborado a partir del recuento de individuos salientes de las flores masculinas y los entrantes en las flores femeninas, presenta un valor estadístico significativo ($F = 10.62$, $p < 0.0115$). Esto indica que el número de hormigas que entran en las flores de un sexo es diferente al número de las que salen del otro. Concretamente, las flores masculinas experimentan la salida de menos hormigas, con una media de (78 ± 22.77 ind/5min), mientras que las flores femeninas experimentan una entrada media de ($115,6 \pm 12.11$ ind/5min).

En segundo lugar, una vez realizado el recuento de los granos de polen adheridos a los individuos (Figura 6, A), se observa que las hormigas salientes de las flores femeninas y entrantes en las flores masculinas, no presentan la misma carga polínica ($F = 444.1$, $p < 2 \times 10^{-16}$). Mas concretamente, debido al elevado nivel de significación del valor “p”, se puede destacar la gran diferencia entre el número de granos de polen transportados por unas y otras hormigas. Cabe destacar, que los “majors” o “soldados” de *P.pallidula* son menos frecuentes en el interior de la flor, pero son capaces de transportar un mayor número de granos de polen (Figura 6, B). Las hormigas salientes de las flores masculinas portan una media de (3.502 ± 2.74 gr.polen/hormiga) mientras que las entrantes en las flores femeninas son portadoras de (0.911 ± 0.849 gr.polen/hormiga).



Figura 6, (A): Obreras de *P.pallidula* en una flor masculina y con granos de polen adheridos. **(B):** “Major” de *P.pallidula* con un gran número de granos de polen adheridos.

Autor: Andrés Acuña

Lo cual muestra, que las hormigas experimentan una gran pérdida de carga polínica en el desplazamiento entre las flores de ambos sexos. Concretamente, se produce un desprendimiento del 74% de los granos de polen, que inicialmente se habían adherido al cuerpo de las hormigas salientes de las flores masculinas. Cada hormiga pierde de media (2.5 ± 0.82 gr.polen). De tal manera que entran un total de 1387.2 hormigas cada hora en el interior de la flor femenina. Y teniendo en cuenta que cada hormiga entrante en la flor, es portadora de una media de 0.911 granos de polen, la cantidad de estos que entra en una flor, en una hora de plena madurez floral es de 1264.

Experimento de exclusión

Los resultados obtenidos en la comparación del cuajado del fruto entre las diferentes categorías de exclusión, mediante un análisis de varianza bifactorial, son significativos (ANOVA bif. $F = 17.666$, $p < 1.53 \times 10^{-12}$). Lo mismo sucede en la comparación entre el cuajado del fruto y los 3 grupos de plantas (G1, G2 y G3)(ANOVA bif. $F = 3.596$, $p < 0.029$). No obstante, la interacción entre las categorías de exclusión y los grupos de plantas, no es significativa ($F = 0.858$, $p < 0.552$). Estos resultados, indican que el cuajado del fruto es muy variable entre las diferentes categorías de exclusión y entre los diferentes grupos de plantas que presentan una u otra especie de hormiga, además de la ausencia de estas.

Experimento de exclusión en plantas con *P.pallidula* (G.1)

Comparando las frecuencias de cuajado del fruto, entre las diferentes categorías de exclusión (Figura 7), se puede observar que la correspondiente a los polinizadores terrestres es menor que la de los polinizadores aéreos. Esto indica que *P.pallidula* juega un papel mas destacado en la polinización de las flores, que abejas y abejorros que acceden por la vía aérea. El grupo control, que no experimentaba ninguna exclusión, presenta una frecuencia de cuajado de 0.73 un valor ligeramente superior al cuajado de frutos de forma natural (sin la presencia de *P.pallidula*).

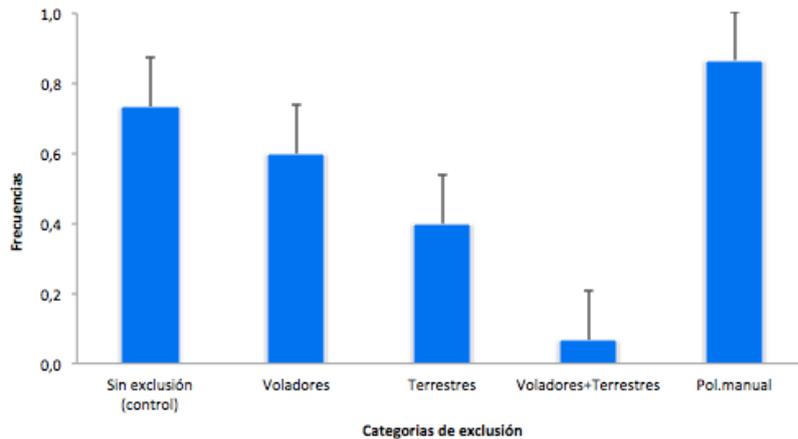


Figura 7: Histograma donde se muestran las frecuencias de cuajado del fruto para las diferentes categorías de exclusión en plantas que presentan *P.pallidula* (media \pm desv.st).

Experimento de exclusión en plantas con *L.niger* (G.2)

En este grupo de plantas, cabe destacar de forma generalizada en casi todas las categorías, que el cuajado del fruto presenta valores muy bajos (Figura 8). Tanto la categoría en la que se excluyen los polinizadores aéreos, como en la que se excluyen los terrestres, el valor del cuajado del fruto no supera el 50 %. Además, se observa que cuando se aísla a la flor de los polinizadores terrestres (*L.niger*), estas presentan una mayor frecuencia de cuajado que cuando no existe ningún tipo de exclusión (control).

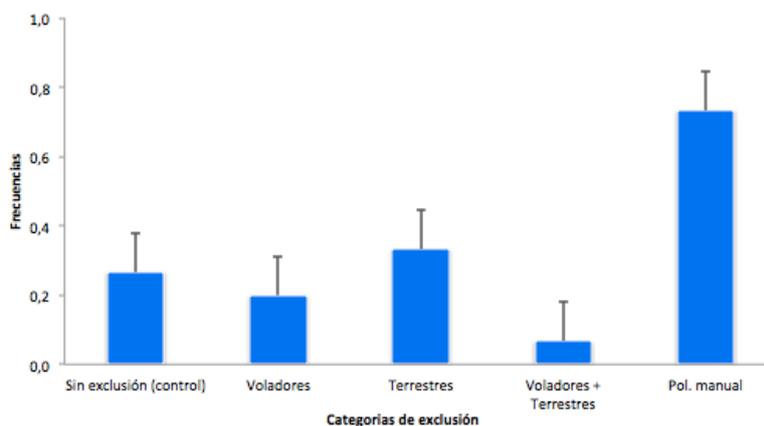


Figura 8: Histograma donde se muestran las frecuencias de cuajado del fruto para las diferentes categorías de exclusión en plantas que presentan *L.niger* (media \pm desv.st).

Esto lleva a pensar, que la presencia de *Lasius niger* en la planta de calabacín, no solamente resulta ineficiente en lo que respecta a la polinización de las flores, sino que puede llegar a ser perjudicial. Cabe destacar, que los valores obtenidos para la categoría control en la que no se ha llevado a cabo ningún tipo de exclusión, son extremadamente bajos (0.26).

El cuajado del fruto de forma natural, no presenta frecuencias tan bajas. Esto tampoco sucede así en el cuajado de frutos mediante la aplicación de una polinización manual (Nepi, 2005). Lo cual nos hace pensar, que *Lasius niger* puede causar un debilitamiento de la planta de calabacín, disminuyendo así el cuajado.

Experimento de exclusión en plantas sin hormigas (G.3)

Como se trata del grupo de plantas que no presentan ninguna hormiga, los resultados que muestra sirven como comparación respecto de los otros dos grupos (G1 y G2)(Figura 9). En este caso se observa que la categoría en la que no se aplica ningún tipo de exclusión, presenta un valor de cuajado adecuado a lo esperado en un ambiente natural aproximándose al 50% descrito por los autores (Guerra-Sanz et al., 2004; Nepi, 2005). Además, destacar que la frecuencia del cuajado se reduce muy poco cuando se lleva a cabo la exclusión de los vectores terrestres y el contrario cuando se aísla a la flor de los vectores que acceden por aire. Esto indica, que los vectores mayormente implicados en la polinización del calabacín de forma natural y en ausencia de hormigas, son los polinizadores que acceden a la flor por la vía aérea.

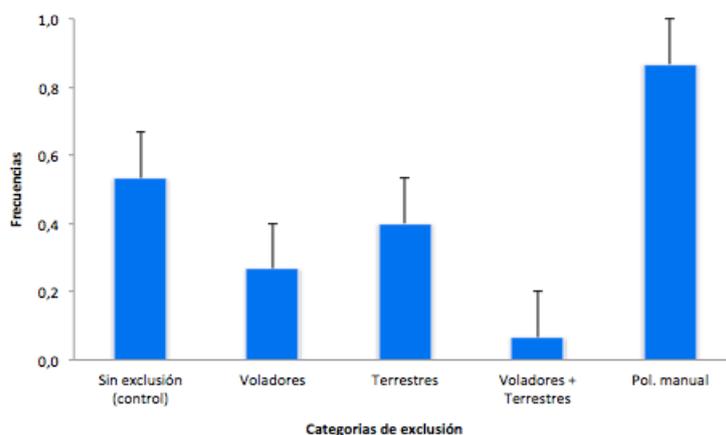


Figura 9: Histograma donde se muestran las frecuencias de cuajado del fruto para las diferentes categorías de exclusión en plantas que presentan *L.niger* (media ± desv.st.).

También cabe destacar, que la polinización mediante una técnica manual proporciona un cuajado del fruto de una forma muy eficiente y satisfactoria así como los mejores resultados en comparación con el resto de categorías. El valor de la frecuencia de cuajado con esta técnica, es muy próximo al 100% (0.93).

Comparación de los 3 grupos de plantas (G1, G2 y G3)

En lo que respecta a la comparación de los tres grupos de plantas (Figura 10), cabe destacar en primer lugar, que el cuajado del fruto en la categoría control, esta liderado por el grupo que presenta *P.pallidula* (G1). Superando al grupo control de plantas (G3) casi en un 25% de fructificación. Esto hace pensar, que *P.pallidula* podría ser la causa de este incremento en el cuajado. Esta hipótesis es refutada cuando se comparan los resultados obtenidos para la categoría de exclusión de voladores y se observa que en el Grupo 1 de plantas, la frecuencia de cuajado se mantiene mucho mas alta que la frecuencia del grupo control (G.3). Y esto a pesar de que los polinizadores voladores, que son los mas importantes de forma natural, quedan aislados de la flor.

En segundo lugar, también cabe destacar los bajos resultados obtenidos para *Lasius niger* en todas las categorías de exclusión. Estos resultados denotan, que esta especie de hormiga no supone ninguna ventaja para la planta en lo que respecta a polinización. Sino todo lo contrario, ya que en la categoría control, donde no se ha llevado a cabo ninguna exclusión, presenta valores de cuajado mas bajos que el grupo de plantas en el que están ausentes las hormigas (G3). Esto indica que perjudica gravemente a la planta y consecuentemente, al cuajado de sus frutos.

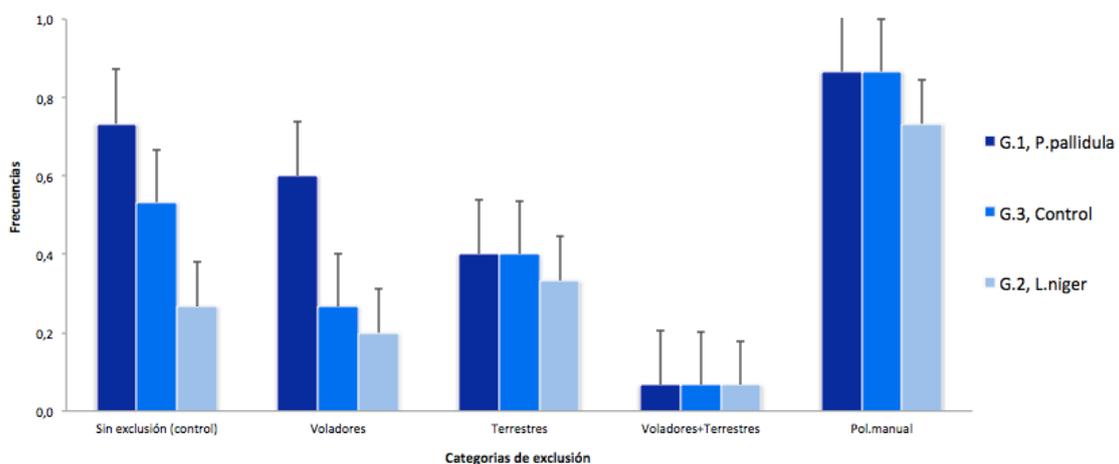


Figura 10: Histograma donde se muestran las frecuencias de cuajado del fruto para las diferentes categorías de exclusión en los grupos de plantas del estudio. G1, G2 y G3. (media \pm desv.st).

Discusión

Los valores obtenidos a partir del recuento de granos de polen, confirman la hipótesis inicial del estudio. *Pheidole pallidula* a pesar de presentar un integumento liso y que a primera vista puede parecer totalmente contrario a la adherencia de los granos de polen (Armstrong 1979), es capaz de transportarlos. Esto es debido a las quetas largas y erectas, que posee recubriendo todo su cuerpo (Detrain, 1990), que retienen los granos como mínimo, el tiempo suficiente para que se lleve a cabo el transporte de una flor a la otra. No obstante, tal i como se ha constatado a partir del recuento, la perdida polínica que experimentan las hormigas durante este desplazamiento entre flores, es muy grande. Esto ya se suponía inicialmente, y es muy probable que sea debido a la limpieza exhaustiva que las hormigas llevan a cabo sobre su cuerpo de forma repetida durante toda su vida (Faegri y van der Pijl, 1979).

A pesar de esto, *P.pallidula* es capaz de transportar polen y aunque experimente una gran perdida en el desplazamiento, esto se ve compensado por el gran numero de visitas que recibe la flor. Ya que el numero medio de hormigas que circulan tanto por las flores masculinas como por las femeninas, es mucho mayor que el numero de visitas llevadas a cabo por otros polinizadores. Si a este ritmo de visitas, se le añade una gran circulación de granos de polen, como es el caso de esta hormiga, se obtiene un correcto cuajado del fruto además de unos elevados niveles de calidad de este (Shivanna y Sawney, 1997; Pinillos y Cuevas, 2008). A pesar de que las flores de ambos sexos son muy visitadas por *P.pallidula*, las femeninas reciben un mayor numero de visitas tal y como han demostrado los resultados. Esta preferencia por las flores femeninas, seguramente es debida a la mayor cantidad de néctar que estas flores poseen en comparación con las masculinas (Nepi, 2005).

Los resultados obtenidos en los experimentos de exclusión con los tres grupos de plantas (G1, G2 y G3), reafirman la capacidad polinizadora de *Pheidole pallidula*. Esto se puede apreciar mediante la exclusión de polinizadores terrestres en el Grupo 1 de plantas, es decir, cuando aislamos a *P.pallidula* de las flores.

Cuando esto sucede, los valores para el cuajado del fruto disminuyen drásticamente si los comparamos con los obtenidos para la categoría control (sin exclusión). No obstante, cuando se lleva a cabo la exclusión de los vectores aéreos, la frecuencia de cuajado no disminuye de forma tan notoria. La explicación de esto, posiblemente se encuentra en que *P.pallidula* cumple la función de los polinizadores aéreos cuando estos se encuentran aislados de la flor. No obstante, si que se aprecia la necesidad de los vectores voladores cuando *P.pallidula* no esta presente en la planta (G.3). En este caso, debido a la falta de un polinizador terrestre, la planta de calabacín depende en su totalidad de abejas y abejorros para la polinización.

En lo que respecta a *Lasius niger*, cabe destacar que se reafirma como especie perjudicial para los cultivos hortícolas y en especial para el de calabacín. Ya que ha causado infinidad de males a la planta, destacándose entre ellos el acceso forzado a las flores todavía por abrirse (Figura 11, B), la depredación del estigma de la flor femenina (Figura 11, C) y finalmente la llevada a cabo de un estrecho mutualismo con distintas especies de áfidos (Figura 11, A), tal y como ya habían descrito otros autores (Miñarro *et al.*, 2009; Miñarro *et al.*, 2010). Esto queda reflejado en los resultados del experimento de exclusión, donde la frecuencia de cuajado para el grupo que poseía esta hormiga (G.2), es muy baja para todas las categorías si se comparan con las del grupo control (G.3).



Figura 11, (A): Flor masculina de calabacín, invadida por pulgones traídos por *L.niger*. **(B):** Entrada forzada de *L.niger* en una flor femenina sin abrir. **(C):** *L.niger* depredando el estigma de una flor femenina.

Autor: Andrés Acuña

Ética y Sostenibilidad

Tal y como ya se ha mencionado con anterioridad, este estudio pretende ofrecer un vector de polinización viable que sirva como alternativa a las técnicas poco respetuosas con el medio ambiente y con el consumidor, que actualmente están siendo utilizadas por los agricultores. Además, una de las reticencias que siempre surgen a la hora de aplicar un vector de polinización asistida, son los posibles peligros que conlleva la liberación de esa especie en los cultivos, que aunque se encuentren aislados del exterior (invernaderos), no lo están en su totalidad. No obstante, esta problemática queda descartada con *Pheidole pallidula*, que como se ha expuesto con anterioridad, es una especie presente en gran parte de la Península Ibérica y Europa. De tal manera que no supondría amenaza alguna para los ecosistemas que rodean las zonas de cultivo puesto que ya esta presente en ellos.

También cabe destacar, que los tres grupos de plantas que se han utilizado para llevar a cabo este estudio, se han mantenido siguiendo un patrón de cultivo ecológico. Sin el uso de pesticidas i/o insecticidas químicos que puedan dañar o perjudicar a los polinizadores naturales. Incluso se han aplicado tratamientos de control biológico mediante larvas de coccinélidos, con el objetivo de reducir las cantidades de pulgón que parasitaban las hojas.

De esta forma, se podrá llevar a cabo, un gran progreso en el campo de la agricultura siempre de la mano, con el desarrollo sostenible y la salud de la sociedad.

Conclusions

- *Pheidole pallidula* is capable of transporting pollen grains in an efficient and continuous form (1264 grains / hour) from the male flowers to female on zucchini plants. During the displacement between flowers, *P.pallidula* experiences a great loss pollen load (74% of the pollen grains fall off from integument) but is offset by the large number of visits.
- *P.pallidula* increased fruit set on zucchini plants where is located (frequency of fruit set 0.73), compared to the control group (frequency 0.56). In contrast, *L.niger* reduces drastically fruit set (frequency 0.28).

Bibliografía

Armstrong, J.A. (1979). Biotic pollination mechanisms in the Australian flora – a review. *New Zealand Journal of Botany* 17: 467–508.

Bosh, J. (2005). The contribution of solitary bees to crop pollination: from ecosystem service to pollinator management. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 151-65.

Cantliffe, D.J. y Vansickle, J.J. (2003). Competitiveness of the Spanish and Dutch greenhouse industries with the Florida fresh vegetable industry. Document HS918. EDIS, Florida.

Castilla, N. (1994). Greenhouses in the Mediterranean areas: *technological level and strategic management*. *Acta Horticulturae*, 361: 44-56.

Castilla, N. (2005). Invernaderos de plástico. Tecnología y manejo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid-Barcelona-México, 462 pp.

Cursach, J., Rita, J. (2012a). Reproductive biology and reproductive output assessment in natural and introduced subpopulations of *Apium bermejoi*, a ‘Critically Endangered’ endemic plant from Menorca (western Mediterranean). *Nordic Journal of Botany* 30: 754–768.

Cursach, J., Rita, J. (2012b). Implications of the reproductive biology of the narrow endemic *Naufraga balearica* (Apiaceae) for its conservation status. *Plant Systematics and Evolution* 298: 581–596.

de Vega, C., Herrera, C.M. (2012). Relationships among nectar-dwelling yeasts, flowers and ants: patterns and incidence on nectar traits. *Oikos* 121: 1878–1888

de Vega, C., Ortiz, P.L., Arista, M., Talavera, S. (2007). The endophytic system of Mediterranean *Cytinus* (Cytinaceae) developing on five host Cistaceae species. *Annals of Botany* 100: 1209–1217.

Detrain C. (1990). Field study on foraging by the polymorphic ant species, *Pheidole pallidula*. *Insectes Soc.* 37: 315-332.

Faegri, K., van der Pijl, L. (1979). The principles of pollination ecology, third edition. Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.

FAO (2002). El cultivo protegido en clima mediterráneo. Cuadernos técnicos de la FAO. Estudios FAO: Producción y Protección Vegetal, 90. FAO, Roma, 324 pp.

FAO (2008). Rapid assessment of pollinators’ status: A contribution to the international initiative conservation and sustainable use of pollinators. FAO, Rome, 124 pp.

FAOSTAT (2012). <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.

Gázquez, J. C., Meca, D., van der Blom, J., Cabrera, A., Romera, E., & Soler, A. (2004). Polinización con abejorro (*Bombus terrestris*) vs bioestimulantes en un cultivo de calabacín en ciclo tardío de otoño campañas 2002/2003 y 2003/2004. *XXXIV Seminario de Técnicos y especialistas en horticultura. Murcia*, 77-86.

Giladi, I. (2006). Choosing benefits or partners: a review of the evidence for the evolution of myrmecochory. *Oikos* 112: 481-492.

Guerra-Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A.S. y Mena-Granero, A. (2004). Pollination of zucchini culture by bumblebees: Advance of results of quality production. En: Lebeda, A. y Paris, H.S. (eds.). *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. Olumouc (República Checa)*, 75-77.

Hanzawa, F.M., Beattie, A.J., Culver, D.C. (1988). Directed dispersal: demographic analysis of an ant-seed mutualism. *The American Naturalist* 131: 1-13.

Holmquist, K.G., Mitchell, R.J., Karron, J.D. (2012). Influence of pollinator grooming on pollen-mediated gene dispersal in *Mimulus ringens* (Phrymaceae). *Plant Species Biology* 27: 77-85.

Inouye, D.W. (1980). The terminology of nectar larceny. *Ecology* 61: 1251-1253.

Kirk, W.D.J (2005). Pollen collection by honey bees. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants. IFAPA, Almería*, 7-18.

Klein, A.M., Vaissie`re, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C. and Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceeding of the Royal Society Biological Sciences*, 274: 303-313.

Krombein, K.V., Hurd, P.D., Smith, D.R. and Burks, B.D. (1979). *Catalogue of Hymenoptera in America North of Mexico.* Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 1224 pp.

MAGRAMA (2014). *Avance Anuario de Estadística, 2014.* Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Miñarro, M., Espadaler, X., Melero, V.X., Suárez-Álvarez, V. (2009). Organic versus conventional management in an apple orchard: effects of fertilization and tree-row management on ground-dwelling predaceous arthropods. *Agricultural and Forest Entomology* 11: 133-142.

Miñarro, M., Fernández-Mata, G., Medina, P. (2010). Role of ants in structuring the aphid community on apple. *Ecological Entomology* 35: 206-215.

Nepi, M. (2005). Physiological and ecological aspects of pollination in *Cucurbita pepo* L. En: Guerra-Sanz, J.M., Roldán Serrano, A. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants. IFAPA, Almería*, 57-70.

- Pinillos, V. y Cuevas, J. (2008).** Artificial pollination in tree crop production. *Horticultural Reviews*, 34: 239-271.
- Reche, J. (1997).** Cultivo de] Calabacín en Invernadero. Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Robinson, R.W. y Reiners, S. (1999).** Parthenocarpy in summer squash. *HortScience*, 34: 715-717.
- Roldán-Serrano, A. (2014).** *Tesis Doctoral: Empleo del abejorro "Bombus terrestris" en la polinización de cultivos hortícolas protegidos del sureste español para mejorar la productividad y calidad de la cosecha. Universidad de Jaén.*
- Roldán-Serrano, A., Guerra-Sanz, J.M., Mena-Granero, A., EgeaGonzález, F.J., Martínez-Vidal, J.L. (2005).** Are the bumblebees able to choose nutritive pollen? En: Guerra Sanz, J.M., Roldán Serrano, A.S. y Mena Granero, A. (eds.). *First Short Course on Pollination of Horticultural Plants*. IFAPA, Almería, 113-121.
- Rundlöf, M. y Smith, H. (2011).** Status and Trends of European Pollinators (STEP Project), Universidad de Lund, 22 pp.
- Rylski, I. y Aloni, B. (1991).** Parthenocarpic fruit set and development in Cucurbitaceae and Solanaceae under protected cultivation in mild winter climate. *Acta Horticulturae*, 287: 117-126.
- Shivanna, K.R. y Sawhney, V.K. (1997).** *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, 468 pp.
- Staplenton, S.C., Wien, H.C. y Morse, R.A. (2000).** Flowering and fruit set of pumpkin cultivars under field conditions. *HortScience*, 35: 1074-1077.
- Traveset, A. (1999).** Ecology of plant reproduction: mating systems and pollination. En: Pugnaire, F.I. y Valladares, F. (eds.) *Handbook of Functional Plant Ecology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 920 pp.
- Webb, C.J. y Lloyd, D.G. (1986).** The avoidance of interferences between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24: 163-178.
- Wilson, E. O. (2003).** *Pheidole in the New World. A dominant hyperdiverse ant genus*. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets: 794 pp
- Zhongjian, L., Lijun, C., Kewei, L., Liqiang, L., Xueyong, M., Wenhui, R. (2008).** Chenorchis, a new orchid genus, and its eco-strategy of ant pollination. *Acta Ecologica Sinica* 28: 2433-2444.