

TESIS DOCTORAL

Miofilia en el cultivo protegido de mango (*Mangifera indica* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) por el sírfido *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) (Diptera: Syrphidae)



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

Manuela Sánchez Fernández

Almería, julio de 2022

Miofilia en el cultivo protegido de mango (*Mangifera indica* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) por el sírfido *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) (Diptera: Syrphidae)

Manuela Sánchez Fernández

Almería, julio 2022

Director de la Tesis:

Dr. Julián Cuevas González

Codirectora de la Tesis:

Dra. Yelitza Velásquez Zambrano

TESIS DOCTORAL

Miofilia en el cultivo protegido de mango (*Mangifera indica* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) por el sírfido *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) (Diptera: Syrphidae)

Miophily in protected cultivation of mango (*Mangifera indica* L.) and watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) by the hoverfly *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) (Diptera: Syrphidae)



**UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AGRICULTURA PROTEGIDA (RD99/11)

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA, ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Manuela Sánchez Fernández

Almería, julio 2022

La presente tesis doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, mediante la ayuda para contratos para la formación de investigadores en empresas (DI-17-09575)



Dr. D. Julián Cuevas González

Catedrático de Universidad

Departamento de Agronomía

Escuela Superior de Ingeniería

Universidad de Almería

JULIÁN CUEVAS GONZÁLEZ, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Miofilia en el cultivo protegido de mango (*Mangifera indica* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) por el sírfido *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) (Diptera: Syrphidae)”, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y recoge el trabajo realizado por la licenciada Manuela Sánchez Fernández para optar al grado de Doctor.

En Almería, 21 de abril de 2022

Fdo.: Julián Cuevas González



Dra. Dña. Yelitza Velásquez

Investigadora externa a la Universidad de Almería

Directora de Investigación y Desarrollo de la empresa Polyfly S.L.

YELITZA VELÁSQUEZ, INVESTIGADORA EXTERNA A LA UNIVERSIDAD DE
ALMERÍA

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Miofilia en el cultivo protegido de mango (*Mangifera indica* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) por el sírfido *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) (Diptera: Syrphidae)”, ha sido realizada bajo mi codirección y asesoramiento y recoge el trabajo realizado por la licenciada Manuela Sánchez Fernández para optar al grado de Doctor.

En Almería, 21 de abril de 2022

Fdo.: Yelitza Velásquez



La alumna de Doctorado Manuela Sánchez Fernández y los directores de la tesis, los Doctores Julián Cuevas González y Yelitza Velásquez, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la alumna bajo la dirección de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Almería a 21 de abril de 2022

Director de la Tesis

Codirectora de la Tesis

Fdo: Julián Cuevas González

Fdo.: Yelitza Velásquez

Alumna de Doctorado

Fdo.: Manuela Sánchez Fernández

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones en jornadas y congresos:

Sánchez, M., Velásquez, Y., González, M., & Cuevas, J. 2022. Activity and foraging behaviour of the hoverfly *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) in protected cultivation of mango (*Mangifera indica* L.). Bulletin of Entomological Research, 112(1), 101-109. doi:10.1017/S0007485321000717

Sánchez, M., Velásquez Y., González M., & Cuevas J. 2021. Los sírfidos eristalinos como polinizadores eficaces de mango. En: X Simposio Ciencias Experimentales Universidad de Almería, 15 de noviembre de 2021, Almería, España.

Sánchez, M. 2021. Polinización de mango con sírfidos. En: Actuaciones fitosanitarias en el cultivo de aguacate y mango, 8 de octubre de 2021, Centro de Investigación IFAPA Campanillas, Málaga, España.

Sánchez, M., Velásquez Y., González M., & Cuevas J. 2021. Innovaciones en el cultivo de mango: Polinización con sírfidos eristalinos en cultivos protegidos. Revista La Caña, 36: 28-31.

Sánchez, M. 2020. La polinización con sírfidos: ensayos de polinización en sandía. En: Jornadas Técnicas Agroalimentarias, La polinización en sandía bajo abrigo, 20 de febrero de 2020, Estación Experimental Fundación Cajamar, Almería, España.

Sánchez, M., Velásquez, Y., González, M., & Cuevas, J. 2019. Actividad polinizadora de los sírfidos eristalinos (Diptera: Syrphidae) en el cultivo protegido de mango. En: XVIII Congreso Ibérico de Entomología, del 10 al 13 de julio de 2019, Madrid, España.

Sánchez, M., Velásquez, Y., González, M., & Cuevas, J. 2019. Comportamiento de forrajeo de los sírfidos eristalinos (Diptera: Syrphidae) en el cultivo protegido de sandía. En: XVIII Congreso Ibérico de Entomología, del 10 al 13 de julio de 2019, Madrid, España.

Sánchez, M. 2018. Biodiversidad de polinizadores: Sírfidos eristalinos como vectores de polinización en cultivos protegidos. En: Congreso Nacional de Medio Ambiente (CONAMA 2018), del 26 al 29 de noviembre de 2018, Madrid, España.

Sánchez, M., Belliure, B., Vázquez-Olivera, M., & Velásquez, Y. 2018. Importancia de los sírfidos eristalinos (Diptera: Syrphidae) en la diversificación de insectos polinizadores. En: IV Jornadas de agroecología "Antonio Bello", del 18 al 21 de abril de 2018, Vila-real, España.

Sánchez, M., Velásquez Y., Vázquez-Olivera, M., González M., & Cuevas J. 2018. Sírfidos (Diptera: Syrphidae): aliados en la polinización del cultivo protegido del mango (*Mangifera indica* L.). Agrícola Vergel 409: 126-129.

ÍNDICE

Agradecimientos	1
ABSTRACT	3
RESUMEN	4
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS DE LA TESIS	
1. Introducción general	7
2. Justificación y objetivos de la Tesis Doctoral	26
3. Bibliografía	28
CAPÍTULO II: ARQUITECTURA FLORAL EN EL CULTIVO PROTEGIDO DE MANGO Y SUS RECOMPENSAS FLORALES A LOS POLINIZADORES	
1. Introducción	41
2. Materiales y Métodos	43
3. Resultados	49
4. Discusión	57
5. Bibliografía	61
CAPÍTULO III: ACTIVITY AND FORAGING BEHAVIOUR OF THE HOVERFLY <i>ERISTALINUS AENEUS</i> (SCOPOLI, 1763) IN PROTECTED CULTIVATION OF MANGO (<i>MANGIFERA INDICA</i> L.)	
Abstract	70
Introduction	70
Materials and methods	71
Results	72
Discussion	74
References	76
CAPÍTULO IV: HOVERFLY POLLINATION ENHANCES YIELD AND FRUIT QUALITY IN MANGO UNDER PROTECTED CULTIVATION	
Abstract	81
Introduction	81
Materials and methods	83
Results	88
Discussion	94
References	98

CAPÍTULO V: BIOLOGÍA, MORFOLOGÍA Y RECOMPENSAS FLORALES DEL CULTIVO PROTEGIDO DE SANDÍA DIPLOIDE Y TRIPLOIDE

1. Introducción	105
2. Materiales y Métodos	106
3. Resultados y Discusión	110
4. Bibliografía	121

CAPÍTULO VI: LA INTERACCIÓN PLANTA-POLINIZADOR DE *ERISTALINUS AENEUS* EN EL CULTIVO DE SANDÍA

1. Introducción	127
2. Materiales y métodos	128
3. Resultados	132
4. Discusión	142
5. Bibliografía	145

CAPÍTULO VII: EFICACIA POLINIZADORA DEL SÍRFIDO *ERISTALINUS AENEUS* BAJO TRES DENSIDADES DE SUELTA EN EL CULTIVO ASOCIADO DE SANDÍA DIPLOIDE Y TRIPLOIDE

1. Introducción	151
2. Materiales y Métodos	153
3. Resultados	160
4. Discusión	171
5. Bibliografía	175

CAPÍTULO VIII: COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE SANDÍA ASOCIADA DIPLOIDE Y TRIPLOIDE EN INVERNADERO BAJO POLINIZACIÓN CON SÍRFIDOS (*ERISTALINUS AENEUS*) Y ABEJAS (*APIS MELLIFERA*)

1. Introducción	181
2. Materiales y Métodos	182
3. Resultados y Discusión	189
4. Bibliografía	199

CAPÍTULO IX: DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL	205
-------------------	-----

CAPÍTULO X: CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES	219
CONCLUSIONS	221

Agradecimientos

El mayor de los agradecimientos se lo debo a las personas que han dirigido, tutorizado y coordinado esta Tesis Doctoral. Al Dr. Julián Cuevas, Dra. Yelitza Velásquez y Dra. Mónica González por darme la oportunidad de desarrollar este gran proyecto, y a mí como investigadora. Por involucraros tanto y sentir la pasión por estos “birchos”.

A Polyfly. A vosotros los fundadores, Marc y Yelitza, por poner en marcha todo esto y lograr, poco a poco, tener este equipo maravilloso del que formo parte, nuestra Flymily. Por ese primer café con Yelitza que dio lugar a esta tesis. Jamás pensé que un “sírfidos polinizadores, ¡qué interesante!” me llevaría tan lejos. Al equipo de Desarrollo, gracias Belén por ser tan buena persona y mostrar siempre tanta empatía. Gracias al equipo de Producción: Laura, Ángel, y resto del equipo, pero sobre todo a Zaida, porque al final teníamos que volver a trabajar juntas. Gracias a todos por hacer de esta Tesis Industrial mi segunda casa y familia.

Al Grupo de Investigación AGR222 de la Universidad de Almería, en especial a Virginia, e Irene. Por tantas charlas, ayuda y apoyo incondicional. A Fernando, Marco y Mercedes, porque vuestros consejos han servido de gran ayuda en esta última etapa de tesis. A todos y cada uno de los profesionales y amigos que han pasado por aquí, y siempre tendrán su hueco.

A todas y cada una de las colaboraciones con magníficos profesionales e investigadores que han permitido que esta tesis se desarrolle. A Palmerillas, por vuestro gran apoyo en todo momento, por acogerme como una más y dejarme estar ahí de domingo a domingo, siempre con una gran sonrisa. En especial a David Meca, por tus grandes consejos agronómicos y por enseñarme a distinguir una sandía madura mirando zarzillo y cama. A Juanjo Hueso, por las charlas mañaneras en la nave 26, que fueron de ayuda en malos momentos, haciéndome así fijar la mente en otras cosas más amenas, como la floración de la pitaya. A IFAPA La Mojonera, en especial Estefanía, Lidia y María del Mar, con ese primer ensayo de cucurbitáceas que fue un gran paso en esta tesis. Al Dpto. de Química y Física de la UAL, por ayudarme a poner a punto algunos de los protocolos que recoge esta tesis y por entusiasmarse con este proyecto, en especial a Ignacio Fernández, Ana Abreu y Anabel Tristán. A Grupo La Caña, porque el mundo subtropical cobró en esta tesis más sentido con vosotros, a Beatriz, Eurne, Alejandro, y Gabi. A la finca experimental UAL-Anecoop, en especial a Paco Palmero por tantas charlas en el U19, tantas horas de calorcito y nuestras apuestas de “¿esa está cuajada? Mañana lo veremos”. Gracias Paco por tu implicación y apoyo en los momentos difíciles de la vida y de la Tesis.

A mis amigos, los de siempre, por aguantar el monotema “Tesis” en los últimos 4 años. Os debo muchas horas, quedadas y momentos divertidos. En especial a Maribel, Mayte y Alberto, chicos....¡¡lo he conseguido!! A todas mis compañeras que se han desarrollado laboral y profesionalmente conmigo, por ser un ejemplo a seguir. Sois mucho más que amigas y os agradeceré siempre vuestro apoyo Gemma Clemente, Lourdes Muela y Carmen Robles.

To the Entomology Research Group of Wageningen UR Greenhouse Horticulture (Wageningen UR Glastuinbouw), for making the stays in Bleiswijk such a wonderful experience. Especially to Ada Leman and Gerben Messelink, for making me feel at home. Hartelijk dank, team.

A toda mi gran familia. Por no dejarme caer, por apoyarme a mí y a mis ideas locas e inquietas. A mi madre, que después de darlo todo por sus hijas se ve las tardes de junio contando semillas de sandía. Eres mi luchadora, gracias mami. A mi padre, porque me ha transmitido todo lo que sabe del mundo agro desde que nací, y aquí está el resultado. A mi hermana Eli, mi ejemplo a seguir desde jovencitas. Porque fuiste una gran influencia durante mis años de universidad en Granada y hacemos un gran equipo, y porque tu frase de “qué orgullosa estoy de ti hermanita” me acompaña cada mañana. A mi hermana Encarni, por devolverme la calma cuando los nervios afloraban, por apoyarme y por darme una parte importante de mi vida, a mis sobrinas, que también han supuesto calma y desconexión en algunos momentos difíciles. A mis cuñados Paco y Sergio, porque vuestra gracia especial le ha dado vidilla a mi estrés. A mis suegros y mis cuñados Glori y JL, por estar pendientes de mí y vivir con tanta emoción esta etapa de mi vida. Suegro Manolo, ¡ahora sí, soy doctora!

A Marcos, por aguantar la presión, por escucharme refunfuñar a lo lejos con la estadística y R, por ayudarme a diseñar “gradillas de andar por casa” para compensar la falta de material en época COVID. Por tu paciencia, por tus ratos en la pizarra ayudándome a plantear tantas dudas. Parece que finalmente no eres Quinto autor, pero sin duda eres una parte fundamental de mí, de mi vida y de esta Tesis. Hagamos ciencia juntos.

Y por último, a todas las personas que en algún momento formaron parte de esta Tesis, de este proyecto, y de mi vida. Todos habéis aportado vuestro granito de arena para que ahora la Doctora Sánchez llegue a un nuevo escalón.

“Me convertí en una especie de máquina de observar hechos y sacar conclusiones”

(C. Darwin)

ABSTRACT

Pollination in protected crops plays a fundamental role in crop productivity and, therefore, its profitability. Yield of protected crops can be reduced by the lack of or incorrect management of pollinating insects inside greenhouses. It should be noted that pollinating insects studied so far for this purpose show different behavior depending on the crop where they are found, even presenting considerable floral preferences that can trigger pollination deficits in those flowers not visited. This happens due to the important modification of environmental conditions in greenhouses or the scarcity of floral resources. During the last few years, the industrial development of insect pollinators has undergone an important impulse (Chapter I). After previous positive field experiences, this Doctoral Thesis proposes the use of cristaline syrphids, more specifically the species *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1873), as a pollinator of two crops of great importance: watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) and mango (*Mangifera indica* L.), both under greenhouse conditions. First, floral rewards and attractions that these two crops presented and that could influence the behavior of *E. aeneus* were studied. It was observed that the biology, phenology and floral rewards offered by the crops favored the attraction of syrphids (Chapter II and V). The activity pattern of *E. aeneus* presented a good adaptation to a wide range of environmental conditions. In addition, its behavior was optimal, with a high number of visits to mango and watermelon flowers in search of pollen and nectar (Chapter III and VI). This Thesis also proved the effect of three release densities of this insect on the production of both crops. It was proved that a release density of 30-45 individuals/m² offers optimum results on the production and quality of mango and watermelon fruits (Chapter IV and VII). Finally, the equal production of watermelon under protected cultivation through pollination with *E. aeneus* with respect to that obtained through the usual management of pollination with *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), confirms the good aptitude of this syrphid as an alternative pollinator of this emblematic crop in Almería (Chapter VIII).

RESUMEN

La polinización en los cultivos protegidos juega un papel fundamental en la productividad de los cultivos y, por tanto, en su rentabilidad. El rendimiento de los cultivos protegidos puede verse reducido por la falta o manejo incorrecto de los insectos polinizadores en el interior del invernadero. Cabe destacar que los insectos polinizadores estudiados hasta el momento para este fin muestran diferente comportamiento según el cultivo sobre el que se encuentre, presentando incluso marcadas preferencias florales que pueden desencadenar déficit de polinización en aquellas flores no visitadas. Esto sucede por la importante modificación de las condiciones ambientales en invernadero o por la escasez de recursos florales. Durante los últimos años, el desarrollo industrial de los insectos polinizadores ha sufrido un importante impulso (Capítulo I). Tras previas experiencias positivas en campo, esta Tesis Doctoral plantea el uso de sírfidos eristalinos, más concretamente la especie *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1873), como polinizador de dos cultivos de gran importancia: la sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) y el mango (*Mangifera indica* L.), ambos bajo invernadero. En primer lugar, se estudiaron las recompensas y atractivos florales que estos dos cultivos presentaban y que podrían ejercer influencia en el comportamiento de *E. aeneus*. Se observó que la biología, fenología y recompensas florales que ofrecen los cultivos favorecen la atracción de los sírfidos (Capítulo II y V). El patrón de actividad de *E. aeneus* presentó una buena adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales. Además, su comportamiento fue óptimo, con un alto número de visitas a las flores de mango y sandía en búsqueda de polen y néctar (Capítulo III y VI). Esta Tesis comprobó, así mismo, el efecto de tres densidades de suelta de este insecto sobre la producción de ambos cultivos. Se demostró que una densidad de suelta de 30-45 individuos/m² ofrece resultados óptimos sobre la producción y calidad de los frutos de mango y sandía (Capítulo IV y VII). Por último, la igual producción de sandía bajo cultivo protegido mediante polinización con *E. aeneus* con respecto a la obtenida a través del manejo habitual de polinización con *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), confirma la buena aptitud de este sírfido como polinizador alternativo de este cultivo emblemático en Almería (Capítulo VIII).

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL **Y OBJETIVOS DE LA TESIS**



1. Introducción general

Los cultivos protegidos

El cultivo protegido es la producción hortofrutícola dentro, bajo o al abrigo de estructuras que proporcionan condiciones climáticas favorables al cultivo y además protección contra plagas y enfermedades. Este sistema permite alargar la temporada de producción y adelantar la recolección de frutos frente a su desarrollo al aire libre. Actualmente, de las 5.630.000 ha de cultivos protegidos a nivel mundial, se estima que 496.000 ha se desarrollan bajo invernadero (Hortidaily, 2021). La mayor parte de la superficie de cultivo protegido en Europa se encuentra principalmente en países de la Cuenca Mediterránea, debido al clima particularmente apropiado de esta región. Esta técnica permite proteger a la plantación del frío en invierno y del exceso de radiación en verano, reduciendo la evapotranspiración y el consumo de agua por kg de fruto obtenido. En España, durante 2020 se registraron un total de 16.929.398 ha de uso agrícola, de los cuales 3.759.398 ha estaban en sistemas de regadío y 71.783 ha de ellas se encontraban además bajo invernadero (Figura 1). La ubicación de los cultivos protegidos en España se halla principalmente en la Cuenca Mediterránea e Islas Canarias, con un 76% de la superficie total (ESYRCE, 2021).

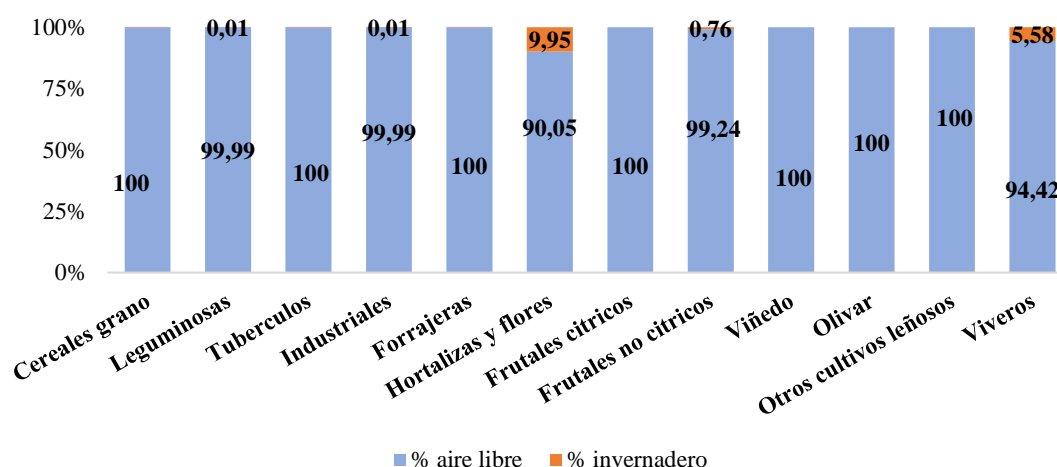


Figura 1. Cultivos al aire libre y en invernadero (%) en España durante 2020. Fuente: ESYRCE, 2021

Las principales plantaciones en invernadero desarrolladas en España corresponden a cultivos herbáceos (61.200 ha), frutales no cítricos (9.397 ha) y viveros (1.186 ha). Las familias de plantas herbáceas más producidas en invernaderos comerciales son las solanáceas (tomate, pimiento y berenjena), cucurbitáceas (pepino, calabacín, melón y sandía), rosáceas (fresas y fresas) y leguminosas (judías) (Guerra-

Sanz, 2008). De estos cultivos hortícolas, en España destaca la sandía, ya que, junto al melón, son cultivos de primavera que complementan la producción hortícola de ciclo de invierno y mejoran los rendimientos económicos de la superficie cultivada. Por otra parte, el mango es un cultivo destacado entre los frutales no cítricos, que presenta grandes oportunidades para su producción bajo invernadero y contribuye a la diversificación de los cultivos hortícolas tradicionales en el sureste español.

El cultivo del mango

Taxonomía y descripción del cultivo de mango

El mango (*Mangifera indica* L.) pertenece a la familia Anacardiaceae (subfamilia Anacardioideae, orden Sapindales, clase Magnoliopsida, división Tracheophyta). Esta familia está constituida por unos 73 géneros con 830-850 especies (Singh, 1960; Yamanaka et al., 2006; Bompard, 2009), de los cuales sólo 4 géneros tienen importante producción de frutos comestibles: *Anacardium* (anacardos), *Mangifera* (mangos), *Pistacia* (pistachos) y *Schinus* (pimienta rosa). El género *Mangifera* consta de 69 especies, divididas en dos subgéneros, *Limus* y *Mangifera*, destacando este último por contener la mayoría de las especies. El subgénero *Mangifera* es de gran interés agronómico por presentar frutos comestibles, como *M. indica*, *M. caesia*, *M. odorata*, *M. pentandra* y *M. pajang*, o porque son empleadas como portainjertos para *M. indica* (Bompard, 1993; Kostermans y Bompard, 1993; Bally et al., 2009). El mango es un árbol de hoja perenne de copa densa y de gran tamaño, que puede alcanzar alturas de 30 m. pero 3-10 m. en árboles cultivados en los subtropicos (Bally, 2006). Sus hojas son simples, sin estípulas y alternas, con forma normalmente oblongas con puntas que varían de redondeadas a puntiagudas. Se trata de una especie andromonoica, que presenta en la misma inflorescencia flores hermafroditas y masculinas en diferente proporción según variedades y condiciones ambientales. Sus flores se agrupan en inflorescencias terminales de tipo panícula, con longitudes, formas y un número variado de flores (Ramírez y Davenport, 2016). Los frutos de *M. indica* pueden ser muy diferentes en forma, color, sabor y textura de la pulpa (Mukherjee, 1997; Bally, 2006; Paull y Duarte, 2011). En todos los casos se trata de una drupa grande y carnosa que contiene un mesocarpio comestible de grosor variable, que suele tener sabor dulce y color que varía del amarillo al naranja y textura de suave a fibrosa. El fruto presenta formas variables, de ovalada a oblonga y alargada, con una comprensión lateral variable, peso entre 50 g y 2 kg, y longitud de 4 a más de 30 cm, dependiendo del cultivar. La piel generalmente presenta

una mezcla de pigmentos verdes, rojos y amarillos, pero el color del fruto maduro depende de la variedad. El fruto es climatérico y durante su maduración la producción de etileno se incrementa. El fruto de mango presenta una única semilla plana, dentro de un endocarpio leñoso, con una testa delgada con apariencia de papel. La semilla aloja uno o varios embriones, lo que diferencia los cultivares en monoembriónicos y poliembriónicos.

La polinización del mango se da tanto por autopolinización como por polinización cruzada, siendo su polinización entomófila y principalmente miofíllica (Ramírez y Davenport, 2012; Cook et al., 2020). Sus flores parecen estar preparadas para ser polinizadas por insectos con probóscides cortas, sin embargo, reciben visitas de una gran diversidad de insectos, siendo poco estudiada la eficacia polinizadora de cada grupo. Algunos trabajos muestran la importancia de los himenópteros en la polinización del cultivo de mango, no obstante, se señalan a los dípteros como principales polinizadores. Otros grupos de insectos detectados durante la floración del mango pertenecen a los grupos de lepidópteros, himenópteros y heterópteros (Anderson et al., 1982; Jiron y Hedstrom, 1985; Galán-Saúco et al., 1997; Fajardo et al., 2008; Souza y Halak, 2009; Sousa et al., 2010; Huda et al., 2015).

Importancia económica del cultivo de mango

El cultivo de *M. indica* es originario del noroeste de India, Bangladesh y la antigua Birmania (Mukherjee, 1997) (Figura 2). Su domesticación tuvo lugar hace más de 4.000 años en India, con variedades monoembriónicas, y en Indochina y Tailandia, con variedades poliembriónicas (Bompard, 2009). Esta especie se ha naturalizado en todos los trópicos y subtrópicos, cultivándose en más de 100 países, llegando a desarrollarse en climas con amplia gama de condiciones ambientales (Galán-Saúco, 1999; Bally, 2006). Su llegada a España fue a través de las Islas Canarias a finales del siglo XVIII, con producciones comerciales a comienzos de los 70, y a comienzos de los 80 del siglo XX en el Sudeste de la Península. Actualmente existen más de mil variedades en todo el mundo, debido a las hibridaciones con especies afines, al amplio rango de condiciones agronómicas en las que se desarrolla y a la recombinación de caracteres (Galán-Saúco, 1999; Ravishankar et al., 2015; Lal et al., 2017). No obstante, todos los cultivares existentes tienen algún defecto y continúa activa el desarrollo de nuevos cultivares comerciales mejorados (Galán-Saúco, 1999).

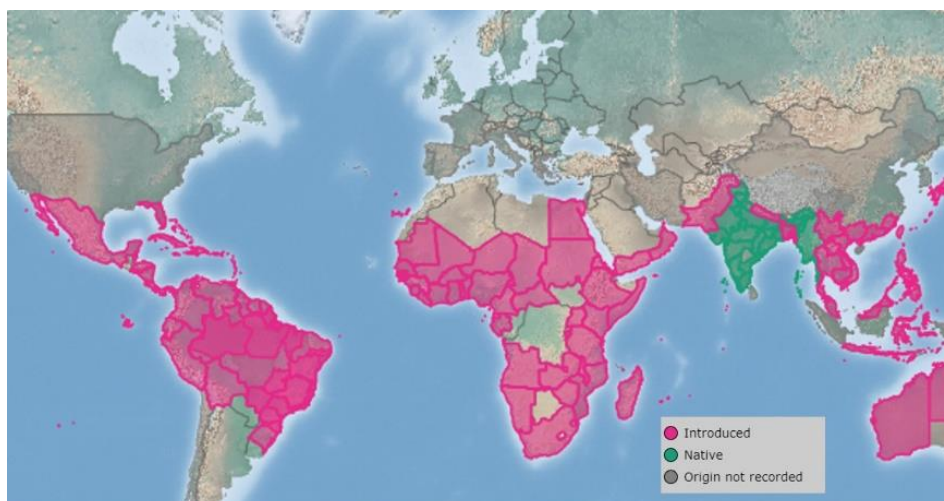


Figura 2. Distribución y origen del cultivo de mango. Fuente: CABI, 2021 (In: *Invasive Species Compendium*)

El comercio mundial de frutas tropicales se ha expandido significativamente en los últimos años, alcanzando un volumen de exportación de unos 8 millones de t. en 2019. A nivel mundial, la piña, el aguacate y el mango son las tres frutas tropicales más comercializadas, incrementándose el mango un 23%, este último año. El mango, junto con mangostán y guayaba, representan aproximadamente el 29% del comercio mundial de frutas tropicales, tanto en cantidad como en valor (FAOSTAT, 2021). Además, la FAO estima que la producción mundial de mangos, mangostanes y guayabas llegarán casi a 73 millones de t. en 2029, incrementándose un 2,9% anualmente. La mayoría de las exportaciones de estos frutos lo realizan países en desarrollo, con aproximadamente el 80% del total de las importaciones.

La superficie de mango se ha incrementado fuertemente durante los últimos 15 años desde las 4.412.076 hasta las 5.588.671 ha a nivel mundial (FAO, 2021). España representa una mínima parte de ese cultivo, con 5.260 ha y 38.243 t, con un rendimiento medio de 7.972 kg/ha (apenas 8 kg/árbol) durante 2020 (Figura 3). La mayoría de la producción está destinada a la venta para consumo humano, con un total de 35.418 t durante 2019, y con un precio medio de venta de 1,08 €/kg (ESYRCE, 2021; Junta de Andalucía, 2021).

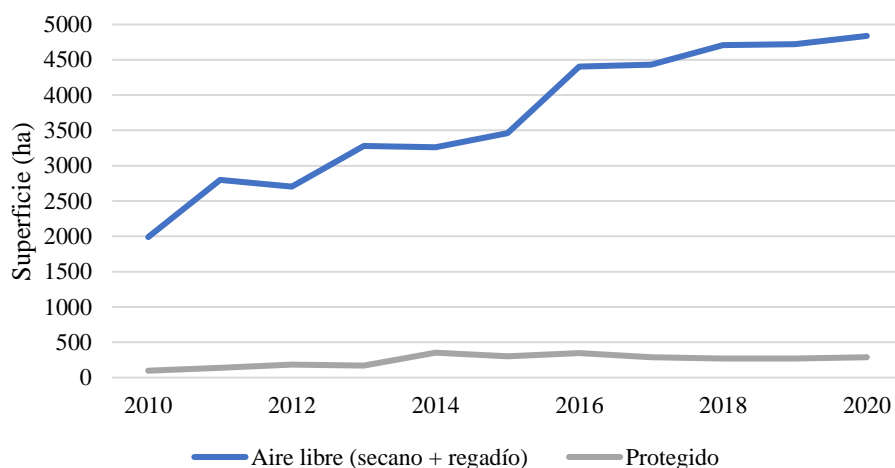


Figura 3. Superficie de mango cultivada en España en los últimos 10 años, mediante sistema de cultivo protegido (invernadero) y aire libre (regadío y secano). ESYRCE, 2021

Desafíos para la mejora de la producción de mango

El sistema de producción del mango por excelencia es al aire libre, fundamentalmente en regadío, pero en los últimos años la producción en invernadero está cobrando importancia, debido a las grandes oportunidades que este sistema ofrece. Las condiciones ambientales que se generan dentro de un invernadero permiten desarrollar cultivos tropicales y subtropicales en zonas con climas adversos, llegando a lograr una producción más temprana (Galán Saúco, 2002). El cultivo protegido de mango en España se ha incrementado en más de un 34%, desde las 98 hasta las 287 ha en los últimos 10 años (ESYRCE, 2021) (Figura 3). En el sur de España, se cultivan al aire libre y en invernadero principalmente cuatro variedades comerciales ‘Osteen’, ‘Keitt’, ‘Kent’ y ‘Tommy Atkins’. Sin embargo, estas y otras variedades cultivadas en ambientes confinados necesitan ser evaluadas para establecer las técnicas de manejo adecuadas, que permitan obtener mayores rendimientos, ampliar los periodos de recolección y lograr una producción precoz. En este sentido, la polinización es uno de los procesos que se encuentra más comprometido debido a la aparición de barreras físicas que impiden o dificultan en gran medida el acceso de los polinizadores silvestres que polinizan de manera eficaz al cultivo. Por otro lado, la implementación de polinizadores comerciales como abejas y abejorros no garantiza una polinización eficaz (Sung et al., 2006). Por ello se hace necesaria la búsqueda de alternativas viables para la polinización de mango en invernadero.

El cultivo de la sandía

Taxonomía y descripción del cultivo de la sandía

La sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) es una planta herbácea perteneciente a la familia Cucurbitaceae, subfamilia Cucurbitoideae, tribu Benincaseae, subtribu Benincasinae, género *Citrullus*. La familia Cucurbitaceae destaca en horticultura por incluir tres géneros de gran importancia económica a nivel mundial: *Cucumis* (*Cucumis melo*, *Cucumis sativus*) (melón, pepino), *Citrullus* (*Citrullus lanatus*) (sandía) y *Cucurbita* (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*) (calabacín, calabaza). El desarrollo inicial de la planta comienza con un brote principal, hasta completar 5-6 hojas bien formadas, comenzando después los brotes de segundo y tercer orden. Se trata de una planta anual, con sistema radicular amplio y superficial, con una raíz principal que se ramifica y subdivide en primarias y secundarias. Los tallos son herbáceos, blandos y verdes, con largas longitudes, tendidos y trepadores, aunque se cultiva principalmente de manera rastrera. Sus tallos están recubiertos por pelos y tienen zarcillos caulinareos con extremo bífido o trifido. Sus hojas son grandes, pecioladas, pinnado-partidas y divididas en 3-5 lóbulos redondeados, que se dividen a su vez en segmentos con entalladuras profundas que no llegan al nervio principal (Reche, 1994). La planta de sandía es principalmente monoica, es decir, las plantas producen flores estaminadas y pistaladas, pero algunas plantas presentan también flores hermafroditas, existiendo antiguos cultivares andromonoicos (Reche, 1994; Delaplane y Mayer, 2000; Paris, 2015). Sus flores son amarillas, con diámetros de 2 a 4 cm que aparecen de manera solitaria en las axilas o nudo del tallo (Paris, 2015). La proporción de flores femeninas y masculinas es variable, siendo más numerosas las flores masculinas, con ratios mínimos de 1:7 y que llegan hasta 1:17 (Wijesinghe et al., 2020). El fruto de la sandía es una baya grande, a veces denominada pepónide, con placenta carnosa y epicarpio quebradizo, liso, con tamaño variable, y formas esféricas, ovaladas o alargadas. El color del interior del fruto varía entre verde claro hasta el blanco, pasando por amarillo claro o intenso, naranja, rosa y rojo (Schaffer y Paris, 2016). El tamaño de los frutos es muy variable, dependiendo de las variedades comerciales, oscilando entre 1,5 y más de 20 kg (Reche, 1994; Schaffer y Paris, 2016). La piel del fruto también presenta diferentes coloraciones, según variedad, pero generalmente es de color verde claro a verde oscuro o reticulado. Sus semillas están homogéneamente distribuidas por la pulpa y son generalmente aplastadas, ovoides, duras y de color variable entre blancas, marrones, amarillas o negras, dependiendo de la

variedad (Reche, 1994). Existen numerosos niveles de ploidía en los cultivares de sandía. Sin embargo, las sandías son diploides originalmente, con 11 pares de cromosomas ($2n = 22$) (Paris et al., 2017). Las formas con mayor importancia económica han sido las diploides ($2n$), triploides ($3n$) y tetraploides ($4n$). Aunque las tetraploides suelen presentar frutos más pequeños que los diploides, se trata de frutos de excelente calidad y mejor germinación en comparación con los diploides (Fehér, 1993).

La polinización en la sandía es entomófila y depende totalmente de insectos. El tipo de flor de la sandía, con un plano más abierto y una corola poco profunda, estaría relacionado con una atracción hacia una variedad de visitantes, a diferencia de otras cucurbitáceas con flores más cerradas como el pepino (Stanghellini et al., 2002). Los visitantes florales de este cultivo son las abejas melíferas, abejorros, abejas silvestres, lepidópteros, dípteros y coleópteros (Stanghellini et al., 1998; Njoroge et al., 2004, 2010; Taha y Bayoumi, 2009; Garantonakis et al., 2016; Campbell et al., 2018). Al tratarse de un fruto multise millado, se requieren numerosas visitas de los polinizadores, que depositen gran cantidad de polen para asegurar el cuajado de los frutos y el calibre y calidad comercial de los mismos (Adlerz, 1966; Stanghellini et al., 1997; Walters, 2005; Winfree et al., 2007).

Importancia económica del cultivo de sandía

La sandía es una planta xerófita originaria de las regiones áridas y semiáridas de África, que fue domesticada inicialmente en Egipto e introducida posteriormente en Asia, Europa y América (Fehér, 1993; Paris, 2015). La sandía actualmente es uno de los principales cultivos hortícolas que se produce y se consume a lo largo de todo el mundo. Se trata de un cultivo centenario del área mediterránea, ya que las condiciones ambientales son aquí las más adecuadas para las exigencias de luz y calor de esta planta. Su fruto es considerado a día de hoy un alimento funcional dotado de importantes sustancias nutricionales y bioactivas que aportan numerosos beneficios en la salud humana (Hdider et al., 2020). A nivel mundial, la superficie de producción no aumentó en los últimos 15 años, disminuyendo de 3.251.717 a 3.084.217 ha, pero sí lo hizo el rendimiento, pasando de 2,8 a 3,3 kg/m² (FAOSTAT, 2021). Los cinco principales países productores de sandía durante 2019 fueron China (60.685.237 t), Turquía (3.870.515 t), India (2.495.000 t), Brasil (2.278.186 t) y Argelia (2.206.866 t).

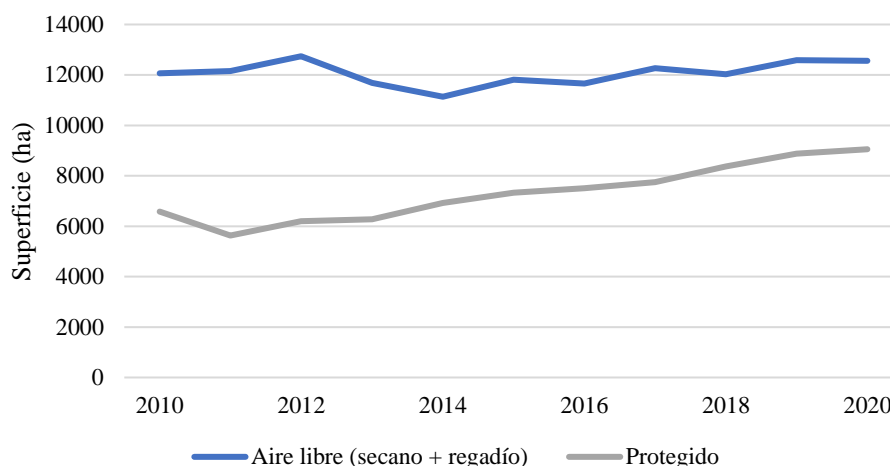


Figura 4. Evolución de la producción del cultivo de sandía al aire libre y en invernadero en España en los últimos 10 años.

Este cultivo ha presentado en los últimos años un leve crecimiento en España, incrementándose en mayor medida en cultivo protegido (Figura 4). La superficie total destinada al cultivo de sandía en España fue de 21.617 ha durante 2020, estando bajo invernadero 9.052 ha. La producción total en 2020 fue de 1.234.850 t., con rendimientos medios de 5,8 kg/ m² en cultivos de regadío al aire libre y protegido. La mayor parte de la producción es destinada a venta para consumo humano, con 1.180.929 t. durante 2020. Esta producción de sandía en España supuso un total de 306 millones de euros, con un precio medio de 0,25 €/kg durante 2019 (ESYRCE, 2021).

Desafíos para la mejora de la producción de sandía

Gracias a la producción de este cultivo de manera intensiva y bajo invernadero, se ha logrado un importante incremento en su rendimiento. Además, se ha ampliado el tiempo de permanencia en el mercado, pudiéndose consumir en primavera y verano (Reche, 1994; Bomfim et al., 2014).

Los cultivares de sandía más cotizados en el mercado corresponden a frutos híbridos sin semillas y cultivos mini. Estas variedades de sandía sin semilla son triploides (3n) y producen polen estéril, haciendo necesario intercalar una variedad polinizadora diploide (2n) cuyo polen fecunde a la flor femenina del genotipo triploide. Este proceso supone un notable desafío, ya que se requiere que ambos cultivares, tanto el donante como el receptor de polen, estén sincronizados en floración, en una proporción de donador y receptor de polen óptima, y ser igualmente atractivos a los insectos vectores tanto en las flores estaminadas como en las pistiladas (Castro-López et al., 2013; Wijesinghe et al.,

2020). El polinizador más empleado en los cultivos protegidos de sandía es la abeja melífera que en ocasiones se combina con abejorros. Sin embargo, diferentes problemas pueden surgir durante la polinización debido a las difíciles condiciones ambientales que se alcanzan en el interior de un invernadero en la temporada de este cultivo (marzo - junio). Los valores de temperaturas y humedad extrema afectan negativamente a la actividad polinizadora de abejas y abejorros. Además, los recintos cerrados también modifican su comportamiento de forrajeo. Estos factores ponen en riesgo el óptimo rendimiento y/o la producción a nivel mundial de diversos cultivos, entre los que se encuentra la sandía en cultivo protegido.

La polinización

El término polinización hace referencia a la transferencia de polen desde los estambres (parte masculina de la flor) hasta el estigma (parte femenina) en las plantas angiospermas, o hasta el micrópilo de los óvulos en las gimnospermas. Esta transferencia de polen hasta los estigmas receptivos es el primer paso en el proceso reproductivo, y hace posible la fecundación, la producción de frutos y de semillas. La fecundación, entendida como la fusión del material genético del polen y del óvulo, es posterior a la polinización, y sin esta, la polinización no tendría valor (Abrol, 2012). Existen dos tipos de polinización, en función de la procedencia del grano de polen que fecunde al óvulo: autopolinización y polinización cruzada. La polinización cruzada promueve la heterocigosis y variabilidad genética en las plantas, aumentando la probabilidad de supervivencia y adaptación de las especies. Esta estrategia reproductiva se ha visto fomentada por las plantas a través de diferentes mecanismos (Heslop-Harrison, 1975; Barrett, 2002; Rea y Nasrallah, 2008; Abdusalam et al., 2021):

- Autoincompatibilidad polen-pistilo: incapacidad parcial o total en plantas hermafroditas o monoicas para producir semillas viables bajo condiciones de autopolinización.
- Dicogamia: consiste en la separación temporal de los sexos de la flor. Hay dos tipos, protoginia (maduración inicial de los órganos femeninos) o protandria (maduración inicial de los órganos masculinos). Esta estrategia se explica también como un mecanismo de evitación de conflicto entre la función masculina, dispersión del polen, y femenina, captación del polen.
- Hercogamia: separación espacial de los sexos a nivel de flor en diferentes estratos. Hay dos tipos hercogamia de aproximación, con el estigma sobresaliendo al

verticilo de estambres, y revertida cuando los estambres sobrepasan al estigma de la flor.

Dentro de esta misma estrategia de separación espacial de los órganos sexuales masculinos y femeninos, cabe también remarcar la monoecia (separación de flores distintas en la misma planta) como ocurre en la sandía, y la dioecia (separación de sexos entre individuos diferentes), si bien estas estrategias tienen otras implicaciones, siendo la más importante quizás, la alteración del número de flores estaminadas y pistiladas

Según Wilcock y Neiland (2002), el fracaso de la polinización se puede producir en todas las etapas del proceso de dispersión del polen y en diferentes niveles. En primera instancia, el riesgo puede asociarse a la falta, rara vez al exceso, de adhesión de polen al estigma, al retraso en la adhesión, a la combinación de diferentes tipos de polen o a que el polen sea de baja calidad. Por otra parte, también se puede asociar a los insectos polinizadores, cuando son escasos o inconstantes, y a las plantas cuando son muy especializadas o selectivas. Por último, también se puede asociar a las poblaciones cuando son demasiado pequeñas en número o uniformes genéticamente, y a las comunidades cuando estas están muy fragmentadas, empobrecidas genéticamente o sometidas a una rápida modificación.

Posteriormente a la polinización sucede la fecundación, que puede ocurrir por diferentes mecanismos de reproducción: cleistogamia (producida en flores que permanecen cerradas donde sucede una autopolinización) o casmogamia, (acontecida en flores abiertas mediante autogamia o alogamia). Las flores cleistógamas presentan pétalos rudimentarios y anteras pequeñas, que liberan poca cantidad de polen. En cambio, las flores casmógamas presentan importantes estructuras y recompensas florales para los visitantes (Abrol, 2012).

Estructuras y recompensas florales

La estructura de la flor sigue un patrón básico, y está compuesta por los órganos sexuales, cubiertos por pétalos de diversos colores que forman la corola, y que están protegidos por el cáliz, formado por sépalos generalmente verdes. El perianto está formado por la combinación del cáliz y corola. La parte masculina de la flor (androceo), está compuesta por los estambres, en cuyos extremos se sitúan las anteras que producen polen. Durante la apertura de las anteras (dehiscencia), numerosos granos de polen son liberados. La parte femenina de la flor (pistilo), está formada por el ovario, que es la

cámara que contiene los óvulos, el estilo, que es el tejido a través del cual crece el tubo polínico, y el estigma, que es el tejido receptivo que reconoce el polen legítimo y promueve la germinación del mismo (Abrol, 2012). Las flores pueden ser solitarias o agruparse en racimos que se conocen como inflorescencias, de los cuales existen diferentes tipos en función de la disposición de sus flores. Así es en el caso del mango donde las flores se disponen formando panículas terminales. Además, existe una serie de señales ópticas en las flores, como color y forma, y señales químicas, como el olor de las mismas, que las flores emplean para atraer a los polinizadores.

Entre los atractivos florales desarrollados por las plantas destacan la coloración del perianto, la emisión de fragancias en los osmóforos y el aumento en el tamaño floral o en el número de flores en las inflorescencias y su compactación (Waser, 1983). Las recompensas que las flores ofrecen a los visitantes son nutritivas y no nutritivas. Entre las recompensas no nutritivas están los subproductos de la estructura floral, que ofrece lugares de apareamiento, material para construcción de nidos e incluso fuentes de calor o lugares para el reposo; pero también hay productos secretados activamente, que actúan como atrayentes sexuales o que son utilizados como materiales de nido. En el caso de las recompensas nutritivas, éstas pueden servir tanto para la nutrición de las larvas, siendo entonces un recurso de cría, o para los adultos, donde encuentran tejidos, aceites grasos, polen y secreciones estigmáticas (Simpson y Neff, 1981), que les sirven de alimento. Las principales recompensas nutritivas corresponden con polen y néctar. Ambas recompensas presentan un alto valor nutritivo ya que contienen proteínas, azúcares, grasas, minerales, vitaminas y aminoácidos libres. Algunas investigaciones consideran que el néctar se producía primeramente en hojas y tallos, extrafloral, antes de que las flores aparecieran, para así excretar el exceso de azúcar en las partes maduras de las plantas, y que posteriormente se incorporaron a las flores con la aparición de las Angiospermas (Abrol, 2012). No olvidemos que la flor es una hoja modificada.

Las angiospermas presentan una exitosa evolución floral sujeta a la selección natural, presentando mayor tasa de diversificación en aquellas que son polinizadas por animales, más concretamente por insectos, frente a las polinizadas por agentes abióticos (Eriksson y Bremer, 1992; Friedman y Barrett, 2009; Wardhaugh, 2015). Se denomina síndrome de polinización a las características que muestran las flores y que han adquirido durante la selección natural impuesta por los diferentes agentes responsables del transporte de polen, los vectores de polinización (Galliot et al., 2006). Estas

características se muestran como recompensas y atractivos florales para los polinizadores, y favorecen el acercamiento a las mismas.

Vectores de polinización

Los vectores de polinización son los agentes encargados de llevar a cabo el transporte de polen entre las diferentes flores. Estos vectores se dividen en dos grupos: vectores abióticos, correspondientes al agua (hidrofilia) y al viento (anemofilia); y vectores bióticos, que corresponden a una alta diversidad de animales (zoofilia). En torno al 80% de las plantas son polinizadas por vectores bióticos, mientras que del 20% restantes, un 98% son polinizadas por viento, y un 2% por agua (Abrol, 2012). Los vectores bióticos de polinización desempeñan por tanto un papel fundamental en la polinización de la mayoría de los cultivos y se estima que más de las tres cuartas partes de los cultivos básicos dependen de la polinización zoofílica (Abrol, 2012). La zoofilia es el tipo de polinización más efectiva y se clasifica en función del tipo de animal que lleva a cabo la polinización como ornitófila (pájaros), quiropterófila (murciélagos), saurófila (reptiles) y entomófila (insectos) (Klein et al., 2007; Abrol, 2012).

El inicio de la relación planta-polinizador data del período Cretácico, momento en que los insectos comenzaron a alimentarse de las flores, produciéndose una mejora en el éxito reproductivo de las plantas debido al transporte del polen (Kearns y Inouye, 1997). La entomofilia puede ser llevada a cabo por diferentes grupos de insectos: cantarofilia (coleópteros), melitofilia (himenópteros), miofilia (dípteros), falanofilia (polillas), psicofilia (lepidópteros) y mirmacofilia (hormigas). La polinización llevada a cabo por dípteros realmente está diferenciada en dos tipos, la miofilia y la sapromiofilia, siendo esta segunda un síndrome de polinización por engaño debido a los fuertes olores desagradables emitidos por la flor y que simulan al de materia en descomposición. Las plantas con síndrome de polinización de miofilia normalmente presentan flores actinomorfas, de colores claros, con presencia de nectarios, olores y fragancias fuertes, con no mucho polen, pero néctar abundante (Wojcik, 2021).

Los polinizadores manejados y su desarrollo industrial

La polinización es considerada un servicio ecosistémico fundamental en la seguridad alimentaria. En torno al 75% de las especies cultivadas para alimentación se benefician en diferente grado de la polinización llevada a cabo por animales, destacando la entomofilia al aire libre y en invernadero (Klein et al., 2007). La superficie agrícola

total se ha incrementado un 41% en los últimos 55 años, con un crecimiento desproporcionado del 137% de los cultivos dependientes de los polinizadores, suponiendo ya un 33% de la superficie agrícola total (Aizen et al., 2019). La polinización juega por tanto un factor fundamental en la producción de alimentos, requiriéndose una polinización eficiente de los cultivos para obtener un mejor y mayor rendimiento (Klein et al., 2007). Se estima que globalmente, el servicio de polinización de los cultivos, ajustados a la inflación de 2020, oscila entre 195 y 387 mil millones de dólares anuales (Porto et al., 2020). No obstante, diferentes alteraciones pueden desencadenar déficits de polinización debido a diversos factores, entre ellos, el desempeño de los vectores de polinización, así como otros factores intrínsecos de las plantas (Wilcock y Neiland, 2002). Este déficit es común entre las plantas silvestres, a pesar de los mecanismos florales para atraer a los polinizadores, y también entre los cultivos (Garibaldi et al., 2018).

En otro orden, a escala global los polinizadores silvestres y domesticados están sufriendo un importante descenso de sus poblaciones y en su distribución debido a la pérdida de hábitat naturales, el cambio climático, los cambios en el uso del suelo y el uso de pesticidas (Kerr et al., 2015; Botías y Sánchez-Bayo, 2018; Garibaldi et al., 2018; Reilly et al., 2020). Este declive se ha registrado desde los años 40 en las colmenas de abejas melíferas domesticadas, siendo muy preocupante el colapso de las colonias durante los últimos años (Neumann y Carreck, 2010). Estos factores se traducen en una escasez y desabastecimiento de colmenas de abejas melíferas empleadas en la polinización de los cultivos, puesto que no crecen al mismo ritmo que lo hacen las superficies de cultivos a polinizar (Williams et al., 2010).

En los cultivos protegidos, las cubiertas plásticas, de vidrio o malla, suponen una barrera física para el acceso de polinizadores silvestres, haciendo prácticamente inexistente el transporte de polen entre flores debido a ellos. Es por ello que debe recurrirse a otros servicios alternativos de polinización como la polinización manual, la aplicación de fitohormonas o bioestimulantes, o la introducción de polinizadores comerciales. La polinización manual supone un coste elevado que en muchas ocasiones no es rentable para la producción de frutos, y se aplica principalmente en productos de alto valor debido a la falta de polinizadores, seguido de una proporción insuficiente de polinizadores o a la dicogamia de los cultivos (Wurz et al., 2021). Por su parte, el uso de fitohormonas y/o bioestimulantes conlleva un mayor gasto de mano de obra y productos hormonales como ANA anamida y un mayor estrés para la planta por envejecimiento

prematureo, sin que se obtenga un mayor rendimiento o calidad de frutos frente a la polinización artificial, mecánica o natural (Roldán-Serrano, 2014; YanJun et al., 2017). Además, las normativas de comercialización europeas imponen plazos de seguridad tras la aplicación de los productos, que en ocasiones son difíciles de cumplir debido a la recolección diaria de frutos, como es el caso del calabacín (Roldán-Serrano, 2014). Por ello, el sistema de cuajado con mayor potencial de uso actualmente consiste en la introducción de polinizadores comerciales.

Los polinizadores manejados son elementos de la biodiversidad asociada a los cultivos, que se introducen en los campos agrícolas para aumentar el rendimiento y calidad de las cosechas, ya que los polinizadores silvestres o autóctonos tienen baja presencia en esa zona determinada. Los sistemas de polinización natural que se manejan actualmente están basados en el uso de himenópteros, como abejas y abejorros (Free, 1993; Delaplane y Mayer, 2000; Klein et al., 2007). Aunque existe una gran diversidad de insectos que potencialmente pueden llevar a cabo la polinización, aproximadamente el 80% de los servicios de polinización son llevados a cabo por el 2% de las especies de polinizadores, siendo actualmente tan sólo 66 las especies utilizadas o bajo estudio para su manejo (Kleijn et al., 2015; Osterman et al., 2021).

Las **abejas melíferas** domésticas se comenzaron a criar en la antigua Grecia en torno al año 650 a.C., conocimiento que posteriormente pasó a los romanos hacia el año 150 a.C., difundándose por la Europa medieval. Finalmente, los descendientes de los apicultores europeos medievales difundieron la práctica de la apicultura y las propias abejas por todo el mundo (Vanengelsdorp y Meixner, 2010). Actualmente son consideradas como los principales polinizadores manejados, debido principalmente a que sus colonias se pueden mantener y transportar fácilmente a los cultivos dependientes de polinizadores (Williams et al., 2010). Sin embargo, su comercialización contribuye a la polinización de un 15% de los cultivos básicos en la alimentación, frente al 80% que es llevado a cabo por otros polinizadores silvestres (Abrol, 2012). El género *Apis* incluye 8 especies, siendo la especie con mayor trascendencia *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), conocida como abeja melífera occidental, y en menor medida *Apis cerana* (Fabricius, 1793), o abeja melífera oriental. En los últimos 60 años, se ha observado un fuerte incremento de más del 85% en el número de colmenas de abejas melíferas manejadas, llegando a más de 92 millones de colonias en 2018 (Osterman et al., 2021). Es difícil estimar los ingresos anuales que supone la actividad de apicultura a nivel mundial, ya que

el precio del servicio de polinización con melíferas oscila entre años y países, siendo aproximadamente de 70 € por colmena en España (comunicación personal de apicultores).

El desarrollo industrial de los **abejorros** comenzó en los años 80 en Europa, cuando se implementó el método de cría comercial de la especie *Bombus terrestris*, que fue distribuido comercialmente por todo el mundo para la polinización del tomate en invernadero. Su rápida distribución mundial se debió a que posteriormente resultó ser un polinizador eficiente en cultivos al aire libre, por su alta disponibilidad comercial y adaptabilidad a diferentes ambientes. Además, supone un menor coste en comparación con la polinización manual (Dafni et al., 2010). Actualmente, son nueve las especies y subespecies producidas y comercializadas mundialmente (*B. atratus* Franklin, *B. canariensis* Smith, *B. hortorum* Linnaeus, *B. huntii* Greene, *B. ignitus* Smith, *B. impatens* Cresson, *B. ruderatus* Fabricius, *B. terrestris audax* Harris y *B. terrestris dalmatinus* Dalle Torre). Ciertamente, existe un gran desarrollo industrial en la cría de diferentes especies de abejorros para su uso en agricultura, y se conoce que existe un gran volumen de producción en las diferentes empresas que se dedican a ello. Son más de 30 las empresas productoras de abejorros en el mundo, siendo las más importantes Koppert Biological Systems, Bunting Brinkman Bees y Biobest. Si bien los datos de producción comercial se desconocen debido a que es información comercial sensible, se estima que ésta supera los 2 millones de colonias al año, con ingresos superiores a cientos de millones de euros (Owen, 2016; Potts et al., 2016).

Las **abejas solitarias** corresponden con el tercer grupo de himenópteros comercializados en la actualidad. A diferencia de las abejas melíferas y abejorros, no tienen colmena por lo que el manejo se realiza de forma individual. Este grupo de polinizadores es utilizado desde la década de los 60 en Japón, donde la especie nativa *Osmia cornifrons* es empleada en un 75% de la superficie de manzano (Bosch y Kemp, 2001). Sin embargo, hasta el momento no se ha desarrollado un método de cría completamente artificial, de forma que el protocolo de manejo para comercializar esta especie consiste en la recolección de capullos en el campo y su introducción en el cultivo a polinizar. Otra forma de manejo consiste en realizar instalaciones de medios artificiales que incentivan la anidación de estas abejas cerca del cultivo, permitiendo que el número de abejas aumente durante los años siguientes. Un total de 8 especies de abejas solitarias, pertenecientes a las abejas cortadoras de hojas (género *Megachile*), abejas albañiles

(género *Osmia*) y abeja alcalina (género *Nomia*), se consideran polinizadores manejados, y otras catorce especies están siendo evaluadas. Aunque la efectividad de las abejas solitarias como polinizadores de diversos cultivos ha sido comprobada, su manejo puede resultar complejo puesto que son especialmente sensibles a la intensificación de la agricultura, pérdida de recursos de forrajeo y problemas de anidación en monocultivos (Winfrey et al., 2011; Wood et al., 2020; Bosch et al., 2021; Khalifa et al., 2021; Osterman et al., 2021). Actualmente, se carece de datos sobre el mercado de estas especies, existiendo sólo algunos datos parciales para algunas especies (Pitts-Singer y Cane, 2011; Potts et al., 2016; Osterman et al., 2021).

En el caso de las **abejas sin aguijón**, se ha observado que tiene la capacidad de polinizar cultivos donde se requiere la vibración de la flor. Sus colonias varían entre 100 y 10.000 obreras. Esto supone un mayor potencial frente a otros polinizadores como los abejorros, que presentan colonias más pequeñas. Por el momento, las abejas sin aguijón no son producidas y comercializadas industrialmente. Sin embargo, un total de 15 especies han sido descritas como potenciales polinizadores para cultivos protegidos (Osterman et al., 2021).

El cultivo protegido puede afectar negativamente al comportamiento de forrajeo de los himenópteros, debido a las condiciones ambientales extremas, llegando incluso a dificultar su manejo por su agresividad en recintos cerrados (Heinrich, 1979; Vogt, 1986; Dag y Eisikowitch, 1995; Vaissière y Froissart, 1996; Occhiuzzi, 1999; Kwon y Saeed, 2003; Amano, 2004; Dag, 2008; Evans et al., 2019; Descamps et al., 2021; Kendall et al., 2021). Por otra parte, la domesticación de las plantas cultivadas ha conllevado a una alteración de las recompensas florales, que influyen en la interacción planta-polinizador, y que pueden repercutir en la salud de estos polinizadores (Egan et al., 2018). Asimismo, los monocultivos proporcionan recursos florales abundantes, pero no diversos, siendo la diversidad floral un factor indispensable para el mantenimiento de la salud y el correcto desarrollo de las colonias de algunos himenópteros generalistas (Tasei y Aupinel, 2008; Brunner et al., 2014). La fuga de estos insectos sociales polinizadores de los invernaderos puede conllevar paradójicamente serios problemas en la flora y fauna adyacente, destacando la competencia en la explotación de los recursos florales, polinización inadecuada de floración autóctona, polinización no deseada de flora exótica, transmisión de patógenos y parásitos a poblaciones silvestres, y la introgresión genética o perturbación de especies polinizadoras nativas (Dafni et al., 2010; Osterman et al., 2021).

Por ejemplo, se ha observado que los abejorros empleados en invernaderos escapan con asiduidad para la búsqueda de alimento en la flora exterior (Whittington et al., 2004; Murray et al., 2013; Trillo et al., 2020). En el caso de *Bombus terrestris*, se ha catalogado incluso como especie invasora en algunos lugares del mundo, debido a características invasivas como alta capacidad de migración, emergencia estacional temprana, alta adaptabilidad bajo condiciones climáticas adversas, estrategias de forrajeo generalistas con forrajeo a grandes distancias, un metabolismo termorregulador que le permite soportar bajas temperaturas, ausencia de enemigos naturales que controlen la población en zonas fuera de su área de distribución natural, y el abejorro además puede desarrollar dos ciclos reproductivos en un año en una zona recién colonizada. Por su parte, la trashumancia masiva de abejas melíferas es una práctica muy extendida que supone un problema en términos de competencia y de transmisión de patógenos a los polinizadores silvestres (Dafni et al., 2010; Tehel et al., 2016; Requier et al., 2019; Trillo et al., 2019, 2021; Russo et al., 2021). Estos problemas muestran la necesidad de cuidar los sistemas de polinización actuales, pero también la necesidad de desarrollar programas de polinización con polinizadores alternativos a los tradicionales (Kearns et al., 1998).

Los dípteros, o **moscas**, son un orden de insectos fundamentales en la biodiversidad polinizadora de la mayoría de los ecosistemas (Larson et al., 2001). Gran cantidad de familias de dípteros visitan las flores silvestres y polinizan eficazmente cultivos. Dentro de este grupo de insectos destacan Syrphidae, Bombyliidae, Muscidae, Tachinidae, Anthomyiidae, Stratiomyidae, Nemestrinidae, Rhiniidae, Sarcophagidae y Calliphoridae (Larson et al., 2001; Raguso, 2001; Dudareva y Pichersky, 2006; Rotheray y Gilbert, 2011; Inouye et al., 2015; Rader et al., 2016; Cook et al., 2020). A pesar de la gran diversidad de dípteros que desarrollan un papel polinizador en la naturaleza, su desarrollo industrial como polinizadores manejados está poco avanzado. Tan sólo tres especies están siendo comercializadas como polinizadores: *Lucilia sericata* (familia Calliphoridae), *Eristalis tenax* y *Eristalinus aeneus* (familia Syrphidae). Por una parte, *Lucilia sericata* es comercializada en Europa por Koppert y Bioplanet, y en Chile por Muxidotecnica. Además, se comercializan larvas de diferentes especies de dípteros como señuelo de pesca, y ocasionalmente en su fase adulta para la polinización de cultivos. En el caso de los sírfidos cristalinos polinizadores, actualmente tan sólo la empresa Polyfly produce y comercializa *Eristalis tenax* y *Eristalinus aeneus*. Otras iniciativas han surgido para establecer comunidades de dípteros en lugares y épocas estratégicas para la

polinización de cultivos como mango, aguacate o berries en Australia y Nueva Zelanda, (Howlett y Gee, 2019; Cook et al., 2020).

Este tipo de insectos son empleados principalmente en la polinización de cultivos para la obtención de semillas, donde los fuertes comportamientos de preferencia floral en himenópteros impiden la obtención de altos rendimientos en la multiplicación de semillas, al no visitar con igual constancia ambas líneas parentales. Además, su potencial uso también deriva de su fácil manejo, adaptable a pequeños recintos, que son comúnmente empleados en la multiplicación de semillas, y donde abejas y abejorros no muestran un buen comportamiento. Además de las tres especies ya en producción y comercialización, existen otras familias de dípteros como Muscidae, Calliphoridae y Sarcophagidae, que muestran cualidades para desarrollarse como polinizadores manejados (Cook et al., 2020; Osterman et al., 2021). Respecto a la familia Syrphidae, existen otras especies consideradas como potenciales polinizadores a desarrollar industrialmente, como es el caso de *Eristalinus taeniops*, *Eristalinus megacefala*, *Eristalis intricaria* o *Eristalis hortícola*, entre otras.

Los sírfidos eristalinos

Los sírfidos, de los cuales hay descritos más de 6000 especies, pertenecen a la familia Syrphidae, orden Diptera, suborden Cyclorrhapha. Son tres las subfamilias que conforman esta familia, con un total de 14 tribus: Microdontinae, Syrphinae (Bacchini, Paragini, Syrphini y Toxomerini) y Eristalinae (Brachyopini, Callicerini, Cerioidini, Eristalini, Eumerini, Milesiini, Pipizini, Rhingiini, Sphegionibacchini y Vollucellini). Su distribución incluye todas las regiones geográficas del mundo, a excepción de la Antártida y algunas islas oceánicas (Thompson y Rotheray, 1998; Rotheray y Gilbert, 2011). Los sírfidos son comúnmente conocidos como moscas de las flores o moscas cernidoras (“flowerflies” o “hoverflies”), debido a dos peculiaridades: su vuelo característico que es rápido y con capacidad de mantenerse sostenido en el aire, y su carácter antófilo con constantes visitas florales. En fase adulta, la mayoría de los sírfidos son generalistas en su asociación con las flores, visitando una gran variedad de flores para alimentarse de néctar y polen, a través de la probóscide tipo chupador (Gilbert, 1981; Kevan y Baker, 1983; Klecka et al., 2018). Los sírfidos muestran grandes similitudes en aspecto y comportamiento a las abejas, abejorros y avispa, debido a que presentan mimetismo batesiano con diversos himenópteros (Golding y Edmunds, 2000; Golding et al., 2005; Merritt et al., 2009). Son insectos diurnos (heliófilos) y algunas especies son migratorias.

Se desarrollan en diversos hábitats, desde zonas naturales como bosques, hasta zonas antropizadas. Sus larvas de aspecto fusiforme y ápodas, tienen diferentes modos de alimentación; las hay fitófagas o micófagas, depredadoras (entomófagas) y saprófagas (Speight, 2011).

Los sírfidos son el grupo de dípteros beneficiosos que más destaca en el sector agrícola, con especial atención para la subfamilia Syrphinae y Eristalinae. Algunas especies son bien conocidas porque sus larvas son eficaces depredadores de áfidos, siendo empleadas como agentes de control biológico de estas plagas (Rodríguez-Gasol et al., 2019; Pekas et al., 2020; Moerkens et al., 2021). Hasta el momento, se ha desarrollado la cría industrial para la comercialización de tres especies afidófagas: *Episyrphus balteatus*, *Sphaerophoria rueppellii* y *Eupeodes corollae*, por las empresas Biobest, Biocon y Bionostrum. Algunos trabajos muestran la contribución de estas especies en la polinización de cultivos como colza, pimiento y fresa (Jauker y Wolters, 2008; Hodgkiss et al., 2018; Dunn et al., 2020; Pekas et al., 2020). Sin embargo, los adultos de estas especies no son polinizadores eficientes por su pequeño tamaño (5 – 12 mm), probóscides cortas (2 – 5 mm) y escasa pilosidad (Gilbert et al., 1985; van Veen, 2004); además su uso en invernadero se limita a bajas densidades de suelta en el cultivo (0,05 – 5 ind/m²) (comunicación personal de técnicos de campo).

Por el contrario, el grupo de sírfidos Eristalini presenta imagos con características propias que los definen como polinizadores eficientes, como gran tamaño corporal (10 – 16 mm) y probóscides alargadas (5 – 8 mm) (Gilbert et al., 1985; van Veen, 2004). Sus cuerpos son negros con patrones morfocromáticos muy variados, con forma robusta y presentan alta pilosidad con setas palinofílicas que permite la adhesión de polen al tegumento (Holloway, 1976; Gilbert et al., 1985; Thompson y Rotheray, 1998; Inouye et al., 2015). Algunas especies son polinívoras muy importantes, llegando incluso a desempeñar un papel fundamental en la polinización de especies endémicas (Pérez-Bañón et al., 2007). Los sírfidos sobresalen por su potencial desarrollo como polinizadores manejados, ya que visitan al menos un 72% de los cultivos alimentarios a nivel mundial, valorándose en unos 280.000 millones de euros al año, sumado a más del 70% de las flores silvestres polinizadas por animales (Doyle et al., 2020). La fase larval de esta subfamilia es fundamentalmente saprófaga, ya que se alimenta de materia orgánica en descomposición.

2. Justificación y objetivos de la Tesis Doctoral

La polinización de los cultivos es un elemento fundamental en los sistemas de producción, puesto que este proceso influye de manera directa en los dos factores que determinarán los beneficios económicos obtenidos: el rendimiento óptimo, medido generalmente como toneladas por hectárea y la calidad de los frutos. Dada la importancia de la polinización en los cultivos hortofrutícolas protegidos, en esta Tesis Doctoral se escogieron los cultivos protegidos de mango y sandía por su potencial económico y agronómico en la zona. Ambos cultivos, mango y sandía, son polinizados a través de entomofilia, pero con estrategias de polinización, biología floral y sistemas reproductivos diferentes. Por su parte, el cultivo de mango es polinado habitualmente por dípteros en cultivos al aire libre, los cuales son atraídos en muchas ocasiones por los productores a través de la colocación en campo de materia orgánica en descomposición (como carne o pescado putrefactos), para así tener un mayor número de visitantes. Inicialmente, no se requiere un gran número de visitas florales en el cultivo de mango, puesto que se trata de un fruto unisemillado donde un único grano de polen viable podría dar lugar a un fruto. Por otra parte, la sandía es polinizada principalmente por himenópteros como abejas melíferas, colocadas por los productores en gran cantidad en sus campos. Para su correcta polinización, es necesario que los insectos realicen una gran cantidad de visitas en cada flor para obtener una mayor deposición de granos de polen en el estigma, puesto que se trata de frutos multiseñillados. La polinización de la sandía presenta en la actualidad además un mayor desafío, puesto que los cultivares con mayor demanda comercial exigen una polinización cruzada entre variedades diploides (con polen fértil) y triploides (sin polen fértil). Los problemas de polinización actuales, derivados del desarrollo del cultivo en el interior de invernaderos que imponen barreras físicas, el declive de los polinizadores con el consecuente déficit de polinización y la necesidad de desarrollar sistemas de producción basados en una mayor biodiversidad, hace necesaria la búsqueda de polinizadores manejados alternativos.

Eristalinus aeneus es un sírfido cuya cría en cautividad y producción masiva ha sido desarrollada recientemente, por lo que la información relacionada con su implementación en campo es limitada. Es una especie de origen paleártico, estando ausente en la Antártida y región Neotropical, pero presenta una distribución homogénea en Europa continental. Se trata de una especie cosmopolita, comúnmente localizada en zonas antropófilas. Es frecuente encontrarla en zonas húmedas como estanques, lagunas

costeras o masas de agua con movimientos lentos, como arroyos, ríos o canales de riego (Marcos-García, 1985; Pérez-Bañón, 2000; Speight, 2011). Los adultos tienen un tamaño medio, de 8 a 12 mm, con un color dorado metálico, y ojos amarillos punteados muy característicos (Figura 5).



Figura 5. Macho de *Eristalinus aeneus* en planta de mango.

Una de las razones que ha motivado la elección de *E. aeneus* para este trabajo es el carácter generalista de la especie. Al igual que otras especies de este género, *E. aeneus* realiza visitas florales en gran diversidad de plantas silvestres y diferentes familias de cultivos, como asteráceas, brassicáceas, amarillidáceas, apiáceas, rosáceas, anacardiáceas, fabáceas y cucurbitáceas (Dag y Gazit, 2000; Sajjad et al., 2008; Khaghaninia et al., 2010; Saeed et al., 2012; Ali et al., 2014; Irshad, 2014; Bharti et al., 2015; Huda et al., 2015; Shakeel et al., 2015; Sáez et al., 2017; Zameer et al., 2017; Trillo et al., 2018; Janković et al., 2019; Latif et al., 2019; Muhammad et al., 2021) Además, su período de vuelo en Europa sucede entre marzo y septiembre, ampliándose hasta octubre en la zona costera. Este período de actividad coincide con la floración de los cultivos de mango y sandía en el sur de España (marzo – mayo), siendo un candidato óptimo para su uso como polinizador manejado en estos cultivos.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es la implementación del sírfido *E. aeneus* como polinizador de cultivos hortofrutícolas protegidos, más concretamente del mango, un árbol subtropical, y sandía, una hortícola rastrera. Para ello, esta tesis se divide

en dos bloques, dedicados a cada una de estas especies. Cada bloque sigue tres objetivos. El primero es determinar la biología y recompensas florales de los cultivos de mango y sandía (Capítulo II y Capítulo V). El segundo es determinar la actividad y el comportamiento de forrajeo en las condiciones ambientales en las que se desarrollan estos cultivos (Capítulo III y Capítulo VI). El tercero es evaluar la capacidad polinizadora del sírfido *E. aeneus* para el cultivo de mango y sandía bajo diferentes densidades de suelta, y en comparación con el manejo habitual de polinización del cultivo (Capítulo IV y Capítulo VII y VIII).

3. Bibliografía

Abdusalam, A., Maimaituexun, R., Hashan, H., Abdukirim, G. 2021. Pollination adaptations of group-by-group stamen movement in a meadow plant with temporal floral closure. *Plant Diversity* 43: 308-316.

Abrol, D.P. 2012. *Pollination Biology: Biodiversity conservation and agricultural production*, pp. 37-54. Springer Netherlands, Dordrecht.

Adlerz, W.C. 1966. Honeybee visit numbers and watermelon pollination. *Journal of Economic Entomology* 59: 28-30.

Aizen, M.A., Aguiar, S., Biesmeijer, J.C., Garibaldi, L.A., Inouye, D.W., Jung, C., Martins, D.J. et al. 2019. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology* 25: 3516-3527.

Ali, M., Saeed, S., Sajjad, A., Bashir, M.A. 2014. Exploring the best native pollinators for pumpkin (*Cucurbita pepo*) production in Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* 46: 531-539.

Amano, K. 2004. Attempts to introduce stingless bees for the pollination of crops under greenhouse conditions in Japan. *Technical bulletin (Asian and Pacific Council. Food & Fertilizer Technology Center)* 167: 1-9.

Anderson, D., Sedgley, M., Short, J., Allwood, A. 1982. Insect pollination of mango in northern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 33: 541-548.

Bally, I.S.E. 2006. *Mangifera indica* (mango). En Elevitech, C. R. (ed.), *Traditional trees of Pacific Islands: Their culture, environment and use*, pp. 441-464. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawaii.

Bally, I.S.E., Lu, P., Johnson, P.R. 2009. Mango Breeding. En *Breeding plantation tree crops. Tropical species*, pp. 51-82. Springer, New York London.

Barrett, S.C.H. 2002. Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88: 154-159.

Bharti, V., Ahlawat, D.S., Sharma, S.K., Singh, N.V., Jitender, J., Singh, N. 2015. Diversity, abundance and pollination efficiency of insect pollinators of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) and effect of abiotic factors on insect pollinator activity. *Journal of Applied and Natural Science* 7: 786-793.

Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., de Aragão, F.A.S., Freitas, B.M. 2014. Adaptive and foraging behavior of two stingless bee species in greenhouse mini watermelon pollination. *Sociobiology* 61: 502-509.

- Bompard, J.M. 2009. Taxonomy and Systematics. En *The Mango: Botany, Production and Uses*, pp. 19-42. CAB International, Wallingford, Oxon.
- Bompard, J.M. 1993. The genus *Mangifera* re-discovered: the potential contribution of wild species to mango cultivation. *Acta Horticulturae* 341: 69-77.
- Bosch, J., Kemp, W.P. 2001. *How to manage the blue orchard bee: as an orchard pollinator*. Sustainable Agriculture Network, Beltsville, MD.
- Bosch, J., Osorio-Canadas, S., Sgolastra, F., Vicens, N. 2021. Use of a managed solitary bee to pollinate almonds: population sustainability and increased fruit set. *Insects* 12: 56.
- Botías, C., Sánchez-Bayo, F. 2018. Papel de los plaguicidas en la pérdida de polinizadores. *Ecosistemas* 27(2): 34-41.
- Brunner, F.S., Schmid-Hempel, P., Barribeau, S.M. 2014. Protein-poor diet reduces host-specific immune gene expression in *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281: 20140128.
- Campbell, J.W., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2018. Fruit set and single visit stigma pollen deposition by managed bumblebees and wild bees in *Citrullus lanatus* (Cucurbitales: Cucurbitaceae). *Journal of Economic Entomology* 111: 989-992.
- Castro-López, A.J., García, E., Caballero, T.M., Linares, L., Piñar, A., Rivas, N., Santillán, N.V. et al. 2013. Seedless watermelons: from the microscope to the table through the greenhouse. *High School Students for Agricultural Science Research* 3: 27-32.
- Cook, D.F., Voss, S.C., Finch, J.T.D., Rader, R.C., Cook, J.M., Spurr, C.J. 2020. The role of flies as pollinators of horticultural crops: An Australian case study with worldwide relevance. *Insects* 11: 341.
- Dafni, A., Kevan, P., Gross, C.L., Goka, K. 2010. *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology* 45: 101-113.
- Dag, A. 2008. Bee pollination of crop plants under environmental conditions unique to enclosures. *Journal of Apicultural Research* 47: 162-165.
- Dag, A., Eisikowitch, D. 1995. The influence of hive location on honeybee foraging activity and fruit set in melons grown in plastic greenhouses. *Apidologie* 26: 511-519.
- Dag, A., Gazit, S. 2000. Mango pollinators in Israel. *Journal of Applied Horticulture* 2: 39-43.
- Delaplane, K.S., Mayer, D.F. 2000. *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing Series, Wallingford, United Kingdom.
- Descamps, C., Jambrek, A., Quinet, M., Jacquemart, A.-L. 2021. Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. *Insects* 12: 493.
- Doyle, T., Hawkes, W.L.S., Massy, R., Powney, G.D., Menz, M.H.M., Wotton, K.R. 2020. Pollination by hoverflies in the Anthropocene. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287: 20200508.
- Dudareva, N., Pichersky, E. 2006. *Biology of floral scent*. CRC Press, Taylor&Francis Group, Florida, USA.
- Dunn, L., Lequerica, M., Reid, C.R., Latty, T. 2020. Dual ecosystem services of syrphid flies (Diptera: Syrphidae): pollinators and biological control agents. *Pest Management Science* 76: 1973-1979.

- Egan, P.A., Adler, L.S., Irwin, R.E., Farrell, I.W., Palmer-Young, E.C., Stevenson, P.C. 2018. Crop domestication alters floral reward chemistry with potential consequences for pollinator health. *Frontiers in Plant Science* 9: 1357.
- Eriksson, O., Bremer, B. 1992. Pollination systems, dispersal modes, life forms, and diversification rates in angiosperm families. *Evolution* 46: 258-266.
- Evans, L.J., Cutting, B.T., Jochym, M., Janke, M.A., Felman, C., Cross, S., Jacob, M., Goodwin, M. 2019. Netted crop covers reduce honeybee foraging activity and colony strength in a mass flowering crop. *Ecology and Evolution* 9: 5708-5719.
- Fajardo, A., Medina, J., Opina, O., Cervancia, C. 2008. Insect pollinators and floral visitors of mango (*Mangifera indica* L. cv. Carabao). *The Philippine Agricultural Scientist* 91: 372-382.
- FAO. 2021. *Major Tropical Fruits: Market review 2020*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAOSTAT. 2021. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data> [Accedido 20 de agosto de 2021].
- Fehér, T. 1993. 21 - Watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. En Kalloo, G., Bergh, B. O. (eds.), *Genetic Improvement of Vegetable Crops*, pp. 295-311. Pergamon, Amsterdam.
- Free, J.B. 1993. *Insect pollination of crops*. Academic Press, London.
- Friedman, J., Barrett, S.C.H. 2009. Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Annals of Botany* 103: 1515-1527.
- Galán Saúco, V. 2002. Greenhouse cultivation of tropical fruits. *Acta Horticulturae* 575: 727-735.
- Galán-Saúco, V. 1999. *El cultivo del mango*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Galán-Saúco, V., Galván, D., Hernández Conde, J.C., Navarro, A. 1997. Preliminary studies on fruit-set of mango cultivar Tommy Atkins under greenhouse cultivation in the Canary Islands. *Acta Horticulturae* 455: 530-537.
- Galliot, C., Stuurman, J., Kuhlemeier, C. 2006. The genetic dissection of floral pollination syndromes. *Current opinion in plant biology* 9(1): 78-82.
- Garantonakis, N., Varikou, K., Birouraki, A., Edwards, M., Kalliakaki, V., Andrinopoulos, F. 2016. Comparing the pollination services of honeybees and wild bees in a watermelon field. *Scientia Horticulturae* 204: 138-144.
- Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Aizen, M.A., Packer, L., Harder, L.D. 2018. Sustainable yields, sustainable growth or neither? En *The potential for insect pollinators to alleviate global pollination deficits and enhance yield of fruit and seed crops*, pp. 35-53. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italia.
- Gilbert, F., Harding, Y., E.F., Line, J.M., Perry, I. 1985. Morphological approaches to community structure in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 224: 115-130.
- Gilbert, F.S. 1981. Foraging ecology of hoverflies: morphology of the mouthparts in relation to feeding on nectar and pollen in some common urban species. *Ecological Entomology* 6: 245-262.
- Golding, Y.C., Edmunds, M. 2000. Behavioural mimicry of honeybees (*Apis mellifera*) by droneflies (Diptera: Syrphidae: *Eristalis* spp.). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267(1446): 903-909.

- Golding, Y.C., Edmunds, M., Ennos, A.R. 2005. Flight behaviour during foraging of the social wasp *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) and four mimetic hoverflies (Diptera: Syrphidae) *Sericomyia silentis*, *Myathropa florea*, *Helophilus* sp. and *Syrphus* sp. *Journal of Experimental Biology* 208: 4523-4527.
- Guerra-Sanz, J.M. 2008. Crop pollination in greenhouses. En *Bee pollination in agricultural ecosystems*, Oxford University Press, New York.
- Hdider, C., Tlili, I., Ilahy, R. 2020. Chapter 32 - Watermelon. En Jaiswal, A. K. (ed.), *Nutritional composition and antioxidant properties of fruits and vegetables*, pp. 515-531. Academic Press.
- Heinrich, B. 1979. «Majoring» and «Minoring» by foraging bumblebees, *Bombus vagans*: An experimental analysis. *Ecology* 60: 245-255.
- Heslop-Harrison, J. 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Annual Review of Plant Physiology* 26: 403-425.
- Hodgkiss, D., Brown, M., Fountain, M. 2018. Syrphine hoverflies are effective pollinators of commercial strawberry. *Journal of Pollination Ecology* 22 (6): 55-66.
- Holloway, B.A. 1976. Pollen-feeding in hover-flies (Diptera: Syrphidae). *New Zealand Journal of Zoology* 3: 339-350.
- Hortidaily. 2021. World greenhouse vegetable statistics updated for 2019. Disponible en: <https://www.hortidaily.com/article/9057219/world-greenhouse-vegetable-statistics-updated-for-2019/> [Accedido 24 de noviembre de 2021].
- Howlett, B.G., Gee, M. 2019. The potential management of the drone fly (*Eristalis tenax*) as a crop pollinator in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 72: 221-230.
- Huda, A.N., Salmah, M.R.C., Hassan, A.A., Hamdan, A., Razak, M.N.A. 2015. Pollination services of mango flower pollinators. *Journal of Insect Science (Online)* 15: 113.
- Inouye, D.W., Larson, B.M.H., Ssymank, A., Kevan, P.G. 2015. Flies and Flowers III: Ecology of foraging and pollination. *Journal of Pollination Ecology* 16: 115-133.
- Irshad, M. 2014. Review: Role of syrphids (Diptera: Syrphidae) as biotic agents and pollinators in Pakistan. *Journal of Bioresource Management* 1(2): 1-9.
- Janković, M., Miličić, M., Nedeljković, Z., Milovac, Ž., Ačanski, J., Vujic, A. 2019. Diversity and structure of hoverfly (Diptera: Syrphidae) communities in agricultural areas in Vojvodina Province (Serbia). A case study on *Brassica napus* L. *Journal of the Entomological Research Society* 21: 1-16.
- Jauker, F., Wolters, V. 2008. Hoverflies are efficient pollinators of oilseed rape. *Oecologia* 156: 819-823.
- Jiron, L.F., Hedstrom, I. 1985. Pollination ecology of mango (*Mangifera indica* L.) (Anacardiaceae) in the neotropic region. *Turrialba* 35: 269-277.
- Junta de Andalucía. 2021. *Observatorio de Precios y Mercados. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural*. Junta de Andalucía. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?ec=default> [Accedido 16 de septiembre de 2021].
- Kearns, C., Inouye, D. 1997. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. *BioScience* 47: 297-307.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W., Waser, N.M. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112.

- Kendall, L.K., Evans, L.J., Gee, M., Smith, T.J., Gagic, V., Lobaton, J.D., Hall, M.A. et al. 2021. The effect of protective covers on pollinator health and pollination service delivery. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 319: 107556.
- Kerr, J.T., Pindar, A., Galpern, P., Packer, L., Potts, S.G., Roberts, S.M., Rasmont, P. et al. 2015. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science* 349: 177-180.
- Kevan, P., Baker, H. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology* 28: 407-453.
- Khaghaninia, S., Jafarlu, M., Khiaban, N.G., Askari, O. 2010. Introduction to hoverflies (Diptera: Syrphidae) of sunflower and pumpkin fields in West Azerbaijan Province-Iran. *Munis Entomology & Zoology* 5(1): 270-277.
- Khalifa, S.A.M., Elshafiey, E.H., Shetaia, A.A., El-Wahed, A.A.A., Algethami, A.F., Musharraf, S.G., AlAjmi, M.F. et al. 2021. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects* 12: 688.
- Klecka, J., Hadrava, J., Biella, P., Akter, A. 2018. Flower visitation by hoverflies (Diptera: Syrphidae) in a temperate plant-pollinator network. *PeerJ* 6: e6025.
- Kleijn, D., Winfree, R., Bartomeus, I., Carvalheiro, L.G., Henry, M., Isaacs, R., Klein, A.-M. et al. 2015. Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nature Communications* 6: 7414.
- Klein, A.-M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 303-313.
- Kostermans, A., Bompard, J. 1993. *The Mangoes. Their botany, nomenclature, horticulture and utilization. International Board for Plant Genetic Resources and Linnean Society of London.* Academic Press, London, UK.
- Kwon, Y.J., Saeed, S. 2003. Effect of temperature on the foraging activity of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) on greenhouse hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Applied Entomology and Zoology* 38: 275-280.
- Lal, S., Singh, A.K., Singh, S.K., Srivastav, M., Singh, B.P., Sharma, N., Singh, N.K. 2017. Association analysis for pomological traits in mango (*Mangifera indica* L.) by genic-SSR markers. *Trees* 31: 1391-1409.
- Larson, B.M.H., Kevan, P.G., Inouye, D.W. 2001. Flies and flowers: taxonomic diversity of anthophiles and pollinators. *The Canadian Entomologist* 133: 439-465.
- Latif, A., Malik, S.A., Saeed, S., Iqbal, N., Saeed, Q., Khan, K.A., Ting, C., Ghramh, H.A. 2019. Diversity of pollinators and their role in the pollination biology of chickpea, *Cicer arietinum* L. (Fabaceae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22: 597-601.
- Marcos-García, M.A. 1985. Los Syrphidae (Diptera) de las sierras occidentales del Sistema Central español. Subfamilias: Erystalinae, Lampetiinae, Microdontinae, Milesiinae y Cerianinae. *Boletín Asociación española Entomología* IX: 187-210.
- Merritt, R.W., Courtney, G.W., Keiper, J.B. 2009. Chapter 76 - Diptera: (Flies, Mosquitoes, Midges, Gnats). En Resh, V. H., Cardé, R. T. (eds.), *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*, pp. 284-297. Academic Press, San Diego.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2021. ESYRCE. *Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE). Encuesta de Marco de Áreas de España.* Disponible en: www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/ [Accedido 10 de diciembre de 2021].

- Moerkens, R., Boonen, S., Wäckers, F.L., Pekas, A. 2021. Aphidophagous hoverflies reduce foxglove aphid infestations and improve seed set and fruit yield in sweet pepper. *Pest Management Science* 77: 2690-2696.
- Muhammad, W., Saeed, S., Ahmad, A., Ishfaq, M.Y., Anjum, M.M. 2021. Pollinator community of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and its role in crop reproductive success. *Asian Journal of Agriculture and Biology* 2021(2): 202007398.
- Mukherjee, S.K. 1997. Introduction: botany and importance. En Litz, R. E. (ed.), *The Mango. Botany, Production and Uses*, pp. 1-19. CAB International, Wallingford.
- Murray, T.E., Coffey, M.F., Kehoe, E., Horgan, F.G. 2013. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation* 159: 269-276.
- Neumann, P., Carreck, N. 2010. Honeybee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49: 1-6.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.M. 2010. Diversity and efficiency of wild pollinators of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) at Yatta (Kenya). *Journal of Applied Horticulture* 12: 35-41.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.W. 2004. Pollination ecology of *Citrullus lanatus* at Yatta, Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science* 24: 73-77.
- Occhiuzzi, P. 1999. Stingless bees thrive in glasshouse trial. *Aussie Bee* 12: 8-11.
- Osterman, J., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Bosch, J., Howlett, B.G., Inouye, D.W., Jung, C. et al. 2021. Global trends in the number and diversity of managed pollinator species. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 322: 107653.
- Owen, R.E. 2016. *Rearing Bumble Bees for research and profit: Practical and Ethical Considerations*. IntechOpen.
- Paris, H.S. 2015. Origin and emergence of the sweet dessert watermelon, *Citrullus lanatus*. *Annals of Botany* 116: 133-148.
- Paris, H.S., Tadmor, Y., Schaffer, A.A. 2017. Cucurbitaceae melons, squash, cucumber. En *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, pp. 209-217. Elsevier.
- Paull, R.E., Duarte, O. 2011. Mango. En Paull, R. E., Duarte, O. (eds.), *Tropical fruits, Volume 1*, pp. 252-290. CABI, Wallingford.
- Pekas, A., De Craecker, I., Boonen, S., Wäckers, F.L., Moerkens, R. 2020. One stone; two birds: concurrent pest control and pollination services provided by aphidophagous hoverflies. *Biological Control* 149: 104328.
- Pérez-Bañón, C., Petanidou, T., Marcos-García, M.Á. 2007. Pollination in small islands by occasional visitors: the case of *Daucus carota* subsp. *commutatus* (Apiaceae) in the Columbretes archipelago, Spain. *Plant Ecology* 192: 133-151.
- Pérez-Bañón, M.C. 2000. *Biología de los sírfidos (Diptera: Syrphidae) de los ecosistemas insulares de la Comunidad valenciana: aspectos de la relación sírfido-planta*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, Alicante.
- Pitts-Singer, T.L., Cane, J.H. 2011. The Alfalfa Leafcutting Bee, *Megachile rotundata*: The world's most intensively managed solitary bee. *Annual Review of Entomology* 56: 221-237.

- Porto, R.G., de Almeida, R.F., Cruz-Neto, O., Tabarelli, M., Viana, B.F., Peres, C.A., Lopes, A.V. 2020. Pollination ecosystem services: A comprehensive review of economic values, research funding and policy actions. *Food Security* 12: 1425-1442.
- Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H.T., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Breeze, T.D., Dicks, L.V. et al. 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* 540: 220-229.
- Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L.A., Garratt, M.P.D., Howlett, B.G., Winfree, R., Cunningham, S.A. et al. 2016. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 146-151.
- Raguso, R.A. 2001. Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior. En Chittka, L., Thomson, J. D. (eds.), *Cognitive Ecology of Pollination*, pp. 83-105. Cambridge University Press.
- Ramírez, F., Davenport, T.L. 2016. Mango (*Mangifera indica* L.) pollination: A review. *Scientia Horticulturae* 203: 158-168.
- Ramírez, F., Davenport, T.L. 2012. Reproductive Biology (Physiology)- The Case of Mango. En *Mango*, pp. 56-81. Studium Press, Houston, Texas.
- Ravishankar, K.V., Bommisetty, P., Bajpai, A., Srivastava, N., Mani, B.H., Vasugi, C., Rajan, S., Dinesh, M.R. 2015. Genetic diversity and population structure analysis of mango (*Mangifera indica*) cultivars assessed by microsatellite markers. *Trees* 29: 775-783.
- Rea, A.C., Nasrallah, J.B. 2008. Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *The International Journal of Developmental Biology* 52: 627-636.
- Reche, J. 1994. *Cultivo intensivo de la sandía*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Reilly, J.R., Artz, D.R., Biddinger, D., Bobiwash, K., Boyle, N.K., Brittain, C., Brokaw, J. et al. 2020. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287: 20200922.
- Requier, F., Garnery, L., Kohl, P.L., Njovu, H.K., Pirk, C.W.W., Crewe, R.M., Steffan-Dewenter, I. 2019. The conservation of native honeybees is crucial. *Trends in Ecology & Evolution* 34: 789-798.
- Rodríguez-Gasol, N., Avilla, J., Alegre, S., Alins, G. 2019. *Sphaerophoria rueppelli* adults change their foraging behavior after mating but maintain the same preferences to flower traits. *BioControl* 64: 149-158.
- Roldán-Serrano, A.S. 2014. *Empleo del abejorro "Bombus Terrestris, L." en la polinización de cultivos hortícolas protegidos del sureste español para mejorar la productividad y calidad de la cosecha*. Tesis Doctoral Universidad de Jaén, Jaén.
- Rotheray, G.E., Gilbert, F.S. 2011. *The Natural History of Hoverflies*. Forrest Text, Wales, UK.
- Russo, L., de Keyzer, C.W., Harmon-Threatt, A.N., LeCroy, K.A., MacIvor, J.S. 2021. The managed-to-invasive species continuum in social and solitary bees and impacts on native bee conservation. *Current Opinion in Insect Science* 46: 43-49.
- Saeed, S., Malik, S., Dad, K., Sajjad, A., Ali, M. 2012. In search of the best native pollinators for bitter melon (*Momordica charantia* L.) pollination in Multan, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* 44: 1633-1641.
- Sáez, L., Pérez-Bañón, C., Driessen, R., Rojo, S. 2017. Use of flies (Diptera, Calliphoridae and Syrphidae) as commercial pollinators in celery crops (*Apium graveolens* var. *rapaceum* and *Apium graveolens* var. *dulce*) under greenhouse conditions. En *9th International Symposium on Syrphidae*, pp. 95. Curitiba, Brazil.

- Sajjad, A., Saeed, S., Masood, A. 2008. Pollinator community of onion (*Allium cepa* L.) and its role in crop reproductive success. *Pakistan Journal of Zoology* 40: 451-456.
- Schaffer, A.A., Paris, H.S. 2016. Melons, Squashes, and Gourds. En *Reference Module in Food Science*, pp. B9780081005965033000. Elsevier.
- Shakeel, M., Inayatullah, M., Ali, H. 2015. Checklist of insect pollinators and their relative abundance on two canola (*Brassica napus*) cultivars in Peshawar, Pakistan. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 326: 326-330.
- Simpson, B., Neff, J. 1981. Floral rewards: Alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 301.
- Singh, L.B. 1960. *The Mango: Botany, Cultivation, and Utilization*. L. Hill, London.
- Sousa, J.H., Pigozzo, C.M., Viana, B.F. 2010. Polinização de manga (*Mangifera indica* L. - Anacardiaceae) variedade Tommy Atkins, no vale do São Francisco, Bahia. *Oecologia Australis* 14: 165-173.
- Souza, D.T.M., Halak, A.L. 2009. Comportamento de forrageamento de abelhas e outros insetos nas panículas da mangueira (*Mangifera indica* L.) e produção de frutos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 31: 335-341.
- Speight, M.C.D. 2011. *Species accounts of European Syrphidae (Diptera)*. Syrph the Net publications, Glasgow.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1998. Seed production in watermelon: A comparison between two commercially available pollinators. *HortScience* 33: 28-30.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1997. The effects of honeybee and bumblebee pollination on fruit set and abortion of cucumber and watermelon. *American Bee Journal* 137: 386-391.
- Stanghellini, M.S., Schultheis, J.R., Ambrose, J.T. 2002. Pollen mobilization in selected cucurbitaceae and the putative effects of pollinator abundance on pollen depletion rates. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 729-736.
- Sung, I.-H., Lin, M.-Y., Chang, C.-H., Cheng, A.-S., Chen, W.-S. 2006. Pollinators and their behaviors on mango flowers in Southern Taiwan. *Formosan Entomologist* 26: 161-170.
- Taha, E.-K.A., Bayoumi, Y.A. 2009. The value of honeybees (*Apis mellifera*, L.) as pollinators of summer seed watermelon (*Citrullus lanatus colothyntoides* L.) in Egypt. 53(1): 33-37.
- Tasei, J.-N., Aupinel, P. 2008. Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39: 397-409.
- Tehel, A., Brown, M.J., Paxton, R.J. 2016. Impact of managed honeybee viruses on wild bees. *Current Opinion in Virology* 19: 16-22.
- Thompson, F.C., Rotheray, G. 1998. Family Syrphidae. En *Manual of Palaearctic Diptera*, 3, pp. 81-139. Natural history Publisher, Oxon, UK.
- Trillo, A., Bartomeus, I., Ortiz-Sánchez, F., Belmonte, J., Vilà, M. 2021. No detectable impact of parasite-infected commercial bumblebees on wild bees in areas adjacent to greenhouses despite diet overlap. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 320: 107604.
- Trillo, A., Herrera, J.M., Vilà, M. 2018. Managed bumble bees increase flower visitation but not fruit weight in polytunnel strawberry crops. *Basic and Applied Ecology* 30: 32-40.

- Trillo, A., Montero-Castaño, A., González-Varo, J.P., González-Moreno, P., Ortiz-Sánchez, F.J., Vilà, M. 2019. Contrasting occurrence patterns of managed and native bumblebees in natural habitats across a greenhouse landscape gradient. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 272: 230-236.
- Trillo, A., Montero-Castaño, A., Vilà, M. 2020. Seasonality of bumblebee spillover between strawberry crops and adjacent pinewoods. *Apidologie* 51: 1051-1061.
- Vaissière, B.E., Froissart, R. 1996. Pollination of cantaloupes under spun bonded row cover by honeybees (Hymenoptera: Apidae) in West Africa. *Journal of Economic Entomology* 89: 1213-1222.
- Vanengelsdorp, D., Meixner, M.D. 2010. A historical review of managed honeybee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 Suppl 1: S80-95.
- van Veen, M.P. 2004. *Hoverflies of Northwest Europe: Identification Keys to the Syrphidae*. KNNV Publishing, The Netherlands.
- Vogt, F.D. 1986. Thermoregulation in bumblebee colonies. I. Thermoregulatory versus brood-maintenance behaviors during acute changes in ambient temperature. *Physiological Zoology* 59: 55-59.
- Walters, S.A. 2005. Influence of honeybee pollination on triploid watermelon fruit set and quality. *HortScience* 40: 1268-1270.
- Wardhaugh, C. 2015. How many species of arthropods visit flowers? *Arthropod-Plant Interactions* 9: 547-565.
- Waser, N.M. 1983. The adaptive nature of floral traits: Ideas and evidence. En Real, L. A. (ed.), *Pollination Biology*, pp. 241-285. Academic Press, Orlando.
- Whittington, R., Winston, M.L., Tucker, C., Parachnowitsch, A.L. 2004. Plant-species identity of pollen collected by bumblebees placed in greenhouses for tomato pollination. *Canadian Journal of Plant Science* 84: 599-602.
- Wijesinghe, S.A.E.C., Evans, L.J., Kirkland, L., Rader, R. 2020. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Scientia Horticulturae* 271: 109493.
- Wilcock, C., Neiland, R. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 7: 270-277.
- Williams, G.R., Tarpy, D.R., van Engelsdorp, D., Chauzat, M.-P., Cox-Foster, D.L., Delaplane, K.S., Neumann, P. et al. 2010. Colony Collapse Disorder in context. *Bioessays* 32: 845-846.
- Winfree, R., Gross, B.J., Kremen, C. 2011. Valuing pollination services to agriculture. *Ecological Economics* 71: 80-88.
- Winfree, R., Williams, N.M., Dushoff, J., Kremen, C. 2007. Native bees provide insurance against ongoing honeybee losses. *Ecology Letters* 10: 1105-1113.
- Wojcik, V. 2021. *Pollinators: Their Evolution, Ecology, Management, and Conservation*. in R. E. R. Ranz (ed.), *Arthropods - Are They Beneficial for Mankind?*, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.97153.
- Wood, T.J., Michez, D., Paxton, R.J., Drossart, M., Neumann, P., Gérard, M., Vanderplanck, M. et al. 2020. Managed honeybees as a radar for wild bee decline? *Apidologie* 51: 1100-1116.
- Wurz, A., Grass, I., Tschamtker, T. 2021. Hand pollination of global crops – A systematic review. *Basic and Applied Ecology* 56: 299-321.

Yamanaka, N., Hasran, M., Xu, D.H., Tsunematsu, H., Idris, S., Ban, T. 2006. Genetic relationship and diversity of four *Mangifera* species revealed through AFLP Analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 949-954.

YanJun, S., Gang, X., WenRui, G., DeCui, L., LongYan, S., Bing, H. 2017. Effects of different pollination methods on yield, quality and benefit of tomato in solar greenhouse. *China Vegetables* 38-41.

Zameer, S.U., Bilal, M., Fazal, M.I., Sajjad, A. 2017. Foraging behavior of pollinators leads to effective pollination in radish *Raphanus sativus* L. *Asian Journal of Agriculture and Biology* 5: 221-227.

CAPÍTULO II: ARQUITECTURA FLORAL
EN EL CULTIVO PROTEGIDO DE MANGO Y
SUS RECOMPENSAS FLORALES A LOS
POLINIZADORES



1. Introducción

La interacción planta-polinizador es uno de los principales pilares de la biodiversidad en el planeta (Ollerton et al., 2011). Las angiospermas han desarrollado diversas estrategias para favorecer su reproducción, destacando la presencia de atractivos y recompensas florales, entre ellas polen y néctar, en aquellas polinizadas por animales. Las características florales juegan, por lo tanto, un papel fundamental en la atracción a los polinizadores y en la reproducción de las angiospermas (Waser, 1983; Raguso, 2001).

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los principales cultivos tropicales a nivel mundial. Las flores de mango se agrupan en panículas o tirso con forma piramidal, cónica o semicircular, de longitud variable, ubicadas principalmente en el extremo del ramo. Estas panículas están formadas por un eje central con ramificaciones laterales que se dividen a su vez en una arquitectura de pedúnculos primarios, secundarios o adicionales, cada uno de los cuales termina en una tríada de flores (Figura 1) (Weberling, 1992; Mukherjee, 1997; Bally, 2006; Ramírez y Davenport, 2012; Azam et al., 2018; Saheda et al., 2019).



Figura 1. Inflorescencia de mango 'Osteen' en invernadero.

Al tratarse de una especie andromonoica, el mango forma flores hermafroditas y estaminadas en la misma inflorescencia. La cantidad de flores presentes en las inflorescencias varía de pocos a varios cientos o incluso miles, dependiendo del cultivar y de la posición de la panícula dentro del árbol (Mukherjee, 1953, 1997; Singh, 1954;

McGregor, 1976; Free, 1993; Chaikiattiyos et al., 1997; Ledesma et al., 2019). La proporción de flores perfectas, hermafroditas, y estaminadas es también variable entre panículas, árboles y cultivares (Singh, 1954; Davenport, 2009; Pérez, 2013; Ledesma et al., 2019).

Las flores son de tamaño pequeño, de entre 5 y 10 mm (Ramírez y Davenport, 2016) (Figura 2). El cáliz está formado por cinco sépalos oblongos, finamente pubescentes y de color verde o amarillo verdoso. La corola está formada por cinco pétalos ligeramente amarillos, con líneas centrales de colores diversos como anaranjados, rosados, violetas o marrones, que varían en función de la edad de la flor (McGregor, 1976; Mukherjee, 1997; Galán-Saúco, 1999; Ledesma et al., 2019). Las flores de mango producen pequeñas cantidades de polen y de néctar (Popenoe, 1917; Siqueira et al., 2008). La liberación de polen de las anteras está condicionada por las condiciones ambientales, siendo mayor durante días soleados (Wet y Robbertse, 1986). El néctar presenta una producción continua a lo largo del día (Siqueira et al., 2008).



Figura 2. Flores de mango 'Osteen' en antesis.

Las características florales del mango han sido descritas por diversos autores recogidos por Ramírez & Davenport (2016). Sin embargo, estos estudios han sido realizados al aire libre, no en cultivo bajo plástico, donde las condiciones ambientales son fuertemente modificadas. Las características florales del mango favorecen la miofilia, la polinización por dípteros (Ramírez & Davenport, 2016). No obstante, existe poca información sobre los atractivos y recompensas que ofrece este cultivo a los insectos polinizadores. Este capítulo de la Tesis Doctoral tiene como objetivo la caracterización

de la biología floral en el cultivo de mango protegido, mediante el análisis de su fenología, arquitectura y morfología floral, además de los recursos que ofrece a sus polinizadores.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal y ubicación del ensayo

Los ensayos se llevaron a cabo durante la primavera de 2021 en la Estación Experimental Fundación Cajamar de El Ejido (Almería, España) ($36^{\circ}47'42.0''N$, $2^{\circ}43'19.4''W$) (Figura 3).



Figura 3. Ubicación de la Finca Experimental Fundación Cajamar. El punto azul indica el invernadero de subtropicales.

El invernadero era de tipo inacral con cubierta plástica tricapa no fotoselectiva, con una superficie total de 432 m^2 , de los cuales, 126 m^2 correspondía a la plantación de mango, donde se encontraban los árboles bajo ensayo que se mantuvieron aislados con malla anti-insectos. El invernadero estaba compuesto por dos capillas de 9 m, orientadas E-O, con dimensiones de 18 m de anchura y 24 m de largo, con una altura en la canaleta de 2,6 m y 3,95 m de altura en cumbre. La plantación de mango estaba constituida por las variedades comerciales 'Osteen', 'Keitt', 'Kent' y 'Tommy Atkins', de cuatro años, y con un marco de plantación de $2 \times 2.5 \text{ m}$ (Figura 4). Para este ensayo, se seleccionaron árboles de la variedad 'Osteen'.



Figura 4. Plantación de mango donde se desarrollaron los ensayos.

El registro de los datos climáticos de temperatura y humedad dentro del invernadero se llevó a cabo con un aspirópsicrómetro ventilado de bulbo seco y bulbo húmedo ventilado, con una sonda PT-100. La gestión del clima se realizó mediante un controlador climático (PRIVA B.V., De Lier, Países Bajos), que registraba la información y gestionaba la apertura y cierre de bandas laterales y ventanas cenitales, con una temperatura de consigna de apertura para la ventilación de 26°C.

Los datos de temperatura obtenidos en el interior del invernadero a lo largo de la floración mostraron que la temperatura media diaria osciló entre los 15,7 °C y los 25,9°C. La media de las temperaturas mínimas osciló entre los 8,1 °C y los 20,9 °C, mientras que la media de las máximas osciló entre 21,8 °C y los 38,3 °C (Figura 5). Por otro lado, la humedad relativa (HR) media diaria osciló entre 30,7% y 88,2%, con mínimas entre 19,0% y 74,1%, y máximas entre 60,0% y 96,0% (Figura 6).

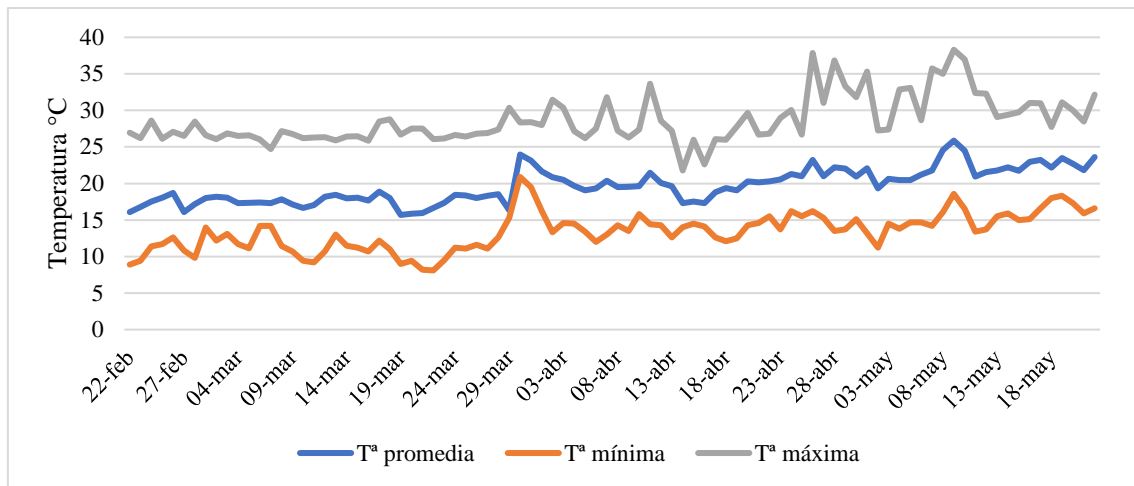


Figura 5. Registro de temperaturas medias, mínimas y máximas durante el ensayo.

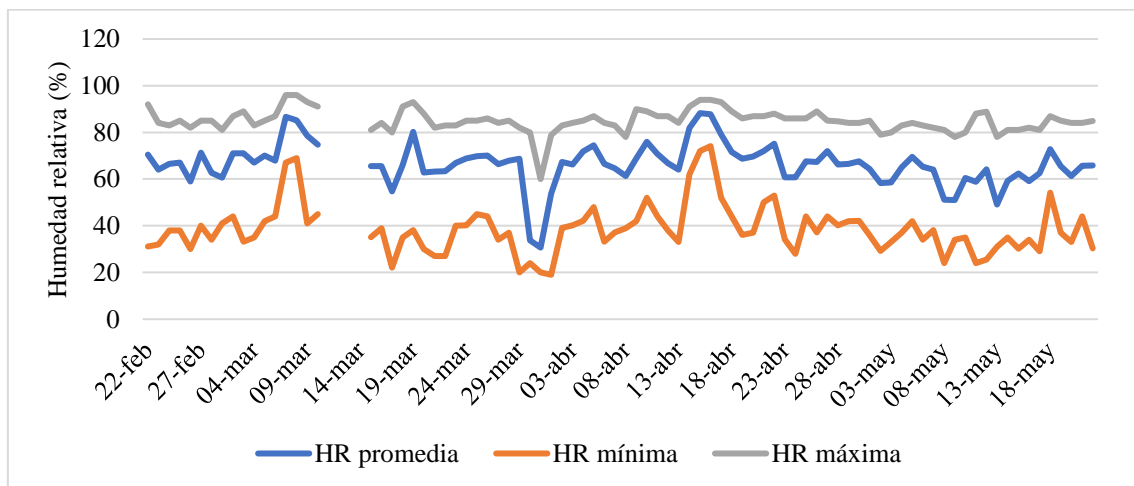


Figura 6. Registro de la humedad relativa media, mínima y máxima durante el ensayo.

2.2. Parámetros evaluados

Arquitectura floral

Al inicio de su desarrollo, se marcaron 23 panículas, localizadas en 3 árboles de la variedad ‘Osteen’ en todas las orientaciones del árbol. La panícula se dividió en tres zonas: apical, media y basal, de las que se retiraron flores en intervalos de cuatro días, anotando el sexo de la flor (hermafrodita y estaminada), la zona de donde procedían (apical, media y basal) y la posición de la flor en la panícula (tipo I, II, III y IV) (Figura 7). Una vez finalizada la floración, se determinó la longitud de las panículas a partir de su eje principal.

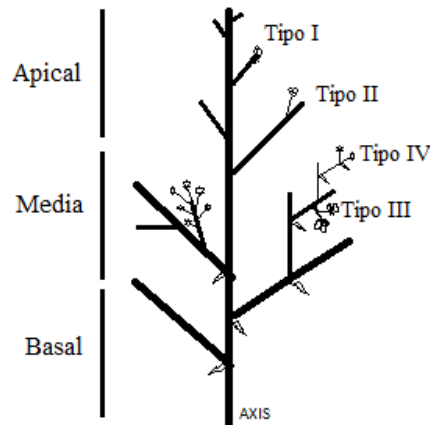


Figura 7. Esquema de la inflorescencia de mango (basado en Ramírez & Davenport, 2016).

Morfología floral

Para la caracterización de ambos tipos de flores, se midió el diámetro de la flor y del disco nectario de 5 flores hermafroditas y 5 flores estaminadas, situadas en posición 1 ó 2, de cada una de las 23 panículas marcadas anteriormente, mediante un calibre digital (PowerFix Z22855). Asimismo, se contabilizó el número de anteras y estaminoides y se anotó el color de los pétalos, discos nectarios y anteras.

Los atractivos florales visuales se determinaron a través de la búsqueda de patrones de coloración y detección de guías nectarías bajo luz ultravioleta. El equipo empleado fue una caja oscura para fotografía, con una fuente de iluminación con bombillas < 300 nm y cámara réflex digital Canon EOS 77D con objetivo fijo 50mm F 2.8 Canon.

Cuantificación de las recompensas florales

El conteo de granos de polen por antera se llevó a cabo el día de su antesis en 5 flores hermafroditas y 5 flores estaminadas, recolectadas en tres panículas diferentes cada día, durante 4 días no consecutivos, con un total de 120 flores (60 hermafroditas y 60 estaminadas). Las anteras fueron colocadas en un portaobjetos, junto con una gota de agua destilada para ayudar a dispersar el polen en el portaobjetos. Posteriormente se añadió una gota de fucsina para la identificación y más fácil conteo del polen, bajo un microscopio Leica DM500 (Figura 8).

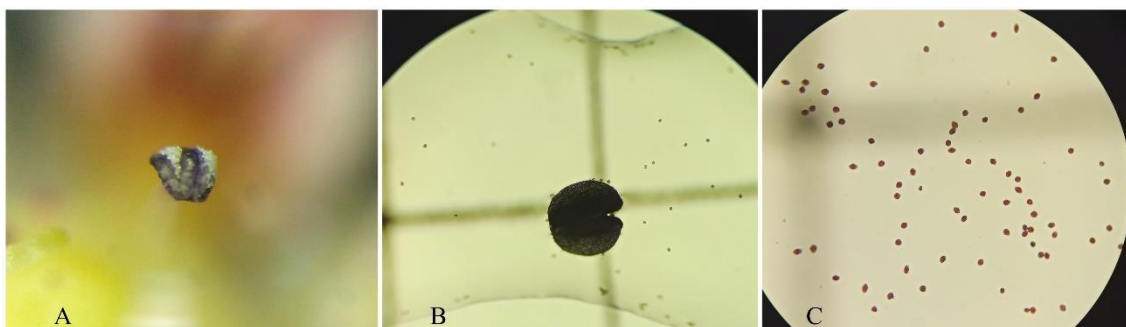


Figura 8. Dehiscencia de la antera de mango (A), preparación para conteo (B) y conteo en microscopía de los granos de polen (C).

El volumen de néctar de cada flor fue estimado mediante una adaptación de la metodología semicuantitativa del punto (Kearns y Inouye, 1993), con mechas de papel de filtro Whatmann n°1 de 2 mm de ancho. Las mechas de papel se pusieron en contacto con los discos nectararios, recorriéndolos durante 30 segundos y recogiendo todo el néctar presente. En el laboratorio se comparó el tamaño de la mancha de néctar obtenido en campo con una serie de manchas producidas a partir de volúmenes conocidos con 38% de sacarosa. El volumen de néctar presente en los discos nectararios se determinó en nueve flores estaminadas y nueve flores femeninas marcadas la mañana de su antesis, tres veces al día, de 9:00-10:00, de 12:00 a 13:00 y de 16:00 a 17:00, durante cinco días no consecutivos, entre el 16 y el 26 de marzo de 2021.

Caracterización nutricional de las recompensas florales

Para el análisis de la composición nutricional del néctar, los discos nectararios de las flores fueron lavados sucesivamente con 2 ml de agua destilada, retirando previamente la antera fértil para evitar contaminaciones. Se utilizaron 10 flores de cada sexo, mezcladas en un mismo vial, de cinco panículas diferentes, y se repitió en cuatro días no consecutivos durante la plena floración, con un total de 400 flores (200 hermafroditas y 200 estaminadas). Para el polen, se analizaron 10 anteras recién abiertas de cada sexo de flor, agrupadas en un mismo vial, recogidas de cinco panículas diferentes, durante cuatro días no consecutivos en plena floración, con un total de 400 flores (200 hermafroditas y 200 estaminadas). Las muestras fueron conservadas a -40° C hasta su análisis. El procedimiento empleado fue el mismo que sirvió para establecer el volumen de néctar producido por las flores en el anterior apartado. Las muestras fueron conservadas a -40° C hasta su análisis. La caracterización de los componentes metabólicos del polen y del

néctar fue realizada por el Departamento de Química y Física de la Universidad de Almería empleando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), siguiendo los protocolos establecidos para la preparación y análisis de muestras, y posterior análisis estadístico (Abreu et al., 2022; Tristán et al., 2022).

Análisis estadístico

Respecto a la arquitectura floral, se realizó una correlación entre el número de flores totales y la longitud de las panículas mediante correlación de Spearman, con un nivel de confianza del 95%. Se comparó el número de flores abiertas según zona de la panícula y, también, de manera independiente, su posición en la panícula mediante tablas de contingencia. Además, se analizó el número de flores de cada sexo en función de su posición y zona de ubicación de la flor mediante un Modelo Lineal Generalizado (GLM), con distribución gaussiana y función de enlace de identidad. Previamente al análisis, el porcentaje de flores fue transformado mediante función arcoseno. Las variables independientes incluidas en el modelo fueron la zona de la panícula (apical, media y basal), el sexo de la flor (estaminada y hermafrodita) y la posición de la flor (valores I, II, III y IV).

Las características morfológicas de las flores (diámetro de pétalos y diámetro de discos nectarios) se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) para los dos tipos de flores. El análisis para determinar diferencias en la cantidad de volumen de néctar entre tipos de flores se realizó mediante una prueba *t* para comparar el volumen de néctar promedio de las flores hermafroditas y estaminada. Además, se desarrolló un Modelo Lineal Generalizado (GLM) para determinar los efectos del tipo de flor y hora del día sobre el volumen de néctar detectado. En el caso del polen, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) del número de granos de polen por antera comparando ambos sexos de la flor. Estos análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el Software R, versión 4.3.1 (Vienna, Austria).

3. Resultados

Arquitectura floral

Las primeras panículas comenzaron su apertura el 22 de febrero de 2021, y las últimas el 24 de marzo (Figura 9). El promedio en la apertura floral de las panículas fue de 60,65 días, con un mínimo de 36 y un máximo de 84.

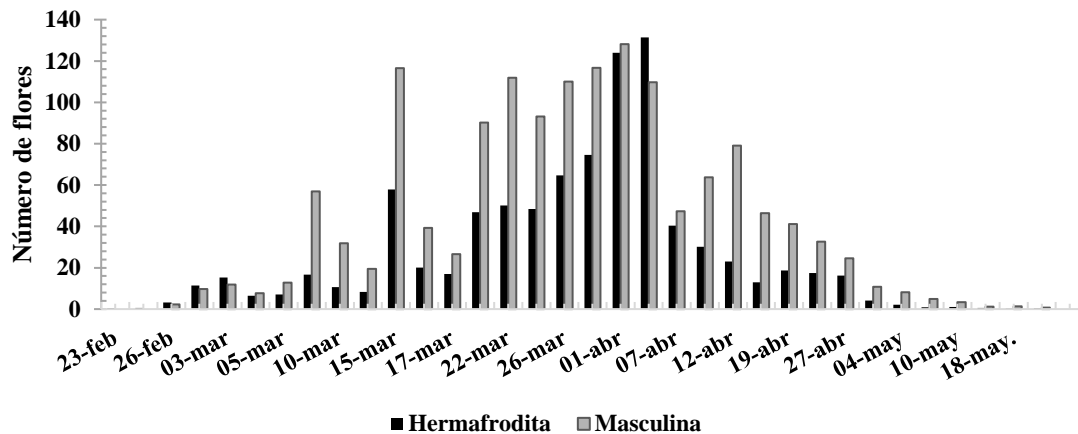


Figura 9. Evolución de la floración (promedio de flores por panícula) de mango 'Osteen' con separación de flores estaminadas y hermafroditas.

El 15 de marzo se observó un primer pico de plena floración, perteneciente a las panículas que comenzaron la floración a finales de febrero. Posteriormente, entre el 26 de marzo y el 7 de abril, se observó un segundo pico más intenso correspondiente a las panículas que habían iniciado su antesis la primera quincena de marzo (Figura 9).

Todas las panículas estudiadas presentaron formas piramidales, con longitud diversa, entre 38,4 y 61,6 cm, siendo el promedio 46 cm (Cuadro 1). Se encontró una alta correlación entre el número de flores y la longitud de las panículas, con un valor de $r_{(21)} = 0,81$; $p < 0,0001$. En total, se recogieron 53.893 flores en las panículas estudiadas. El promedio de flores por panícula fue de 2.343, con un mínimo de 844 y un máximo de 5.043.

Respecto a la distribución de las flores dentro de la panícula, se observó una distribución igual a la representada en la figura 5. El mayor porcentaje correspondió a flores estaminadas (62,71%) frente a flores hermafroditas (37,29%). Sin embargo, este patrón de distribución por sexos de la flor fue diferente según panícula (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de flores hermafroditas y estaminadas en las panículas de mango

Panícula	Longitud (cm)	Hermafrodita		Estaminada		Flores totales
		Nº flores	% flores	Nº flores	% flores	
1	57,4	1.381	38,86%	2.173	61,14%	3.554
2	50,6	1.238	38,13%	2.009	61,87%	3.247
3	45,4	1.321	36,97%	2.252	63,03%	3.573
4	38,4	369	20,88%	1.398	79,12%	1.767
5	61,6	2.055	43,42%	2.678	56,58%	4.733
6	45,2	927	53,96%	791	46,04%	1.718
7	50,6	1.127	41,53%	1.587	58,47%	2.714
8	39,7	677	27,17%	1.815	72,83%	2.492
9	57,1	2.420	47,99%	2.623	52,01%	5.043
10	42,2	871	58,73%	612	41,27%	1.483
11	40,9	122	14,45%	722	85,55%	844
12	43,8	776	51,60%	728	48,40%	1.504
13	42,8	268	18,62%	1.171	81,38%	1.439
14	39,5	512	24,37%	1.589	75,63%	2.101
15	44,7	274	17,64%	1.279	82,36%	1.553
16	44,7	1.095	39,76%	1.659	60,24%	2.754
17	38,8	1.103	55,43%	887	44,57%	1.990
18	41,3	772	56,97%	583	43,03%	1.355
19	40,6	377	41,02%	542	58,98%	919
20	50,2	775	31,10%	1.719	68,90%	2.495
21	48,6	472	30,55%	1.074	69,45%	1.547
22	41,8	757	51,18%	722	48,82%	1.479
23	51,6	625	17,41%	2.964	82,59%	3.589
PROMEDIOS	45,98	883,28	37,29%	1.459	62,71%	2.343,17

El promedio de flores en la zona apical fue de 674, de 586 en la zona media y de 1.083 en la basal. La distribución asimétrica de flores hermafroditas y estaminadas se mantuvo en las diferentes zonas de la panícula ($\chi^2 = 20,116$, $df = 2$; $p < 0.0001$). Tan sólo en la zona apical, se observaron más flores hermafroditas que estaminadas (Apical: 57,1% hermafroditas versus 42,9% estaminadas; Media: 33,8% hermafroditas versus 66,2% estaminadas; Basal: 27,7% hermafroditas versus 72,28% estaminadas).

En relación al tipo de flor según su posición, se registró un mayor porcentaje de flores de tipo II y III (49,6% y 38,1%, respectivamente), menos de tipo I (9,6%), y fue poco frecuente el tipo IV (2,7%), llegando a la ausencia de flores Tipo IV en algunas panículas. También se detectó que el sexo de la flor estaba relacionado con su posición, siendo esta significativamente diferente según sexo de la flor ($\chi^2 = 251,56$, $df = 3$; $p <$

0.0001). Las flores tipo I eran mayoritariamente hermafroditas (77,0 % vs. 23,0%). Sin embargo, en la posición tipo II hubo un porcentaje similar de flores hermafroditas y estaminadas (46,2% y 53,8%, respectivamente). Las flores en posición tipo III eran mayoritariamente estaminadas (75,5% vs. 24,5%). Por último, la mayoría de las flores que aparecían en la posición tipo IV correspondía con flores estaminadas (82,0% vs. 18,0%). Se probó, por tanto, que el sexo de las flores estaba determinado por la zona y la posición dentro de la panícula (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultado del Modelo Lineal Generalizado para la variable número de flores presentes en la inflorescencia (Análisis de la Devianza, tipo III).

	S.C.	G.L.	F	Pr (>F)
Zona panícula	0,0005	2	6,0808	0,0025 **
Sexo flor	0,0018	1	41,0237	< 0,0001 ***
Tipo posición	0,0103	3	78,0242	< 0,0001 ***
Zona * Sexo flor	0,0004	2	4,2135	0,0153 *
Zona * Tipo Posición	0,0009	6	3,4389	0,0024 **
Sexo flor * Posición	0,0027	3	20,6191	< 0,0001 ***
Zona*Sexo*Tipo	0,0010	6	3,9285	0,0007 ***
Posición				
Residuos	0,0232	528		

Así, la mayor cantidad de flores fueron del sexo masculino, de tipo III y dispuestas en la zona basal. En la zona apical y media, las flores estaminadas también eran, en mayor medida, de tipo II y III. Las flores hermafroditas presentes en las panículas fueron mayormente de tipo II y ubicadas preferentemente en las zonas apicales, pero también en zonas medias y basales para esa misma posición (Figura 10).

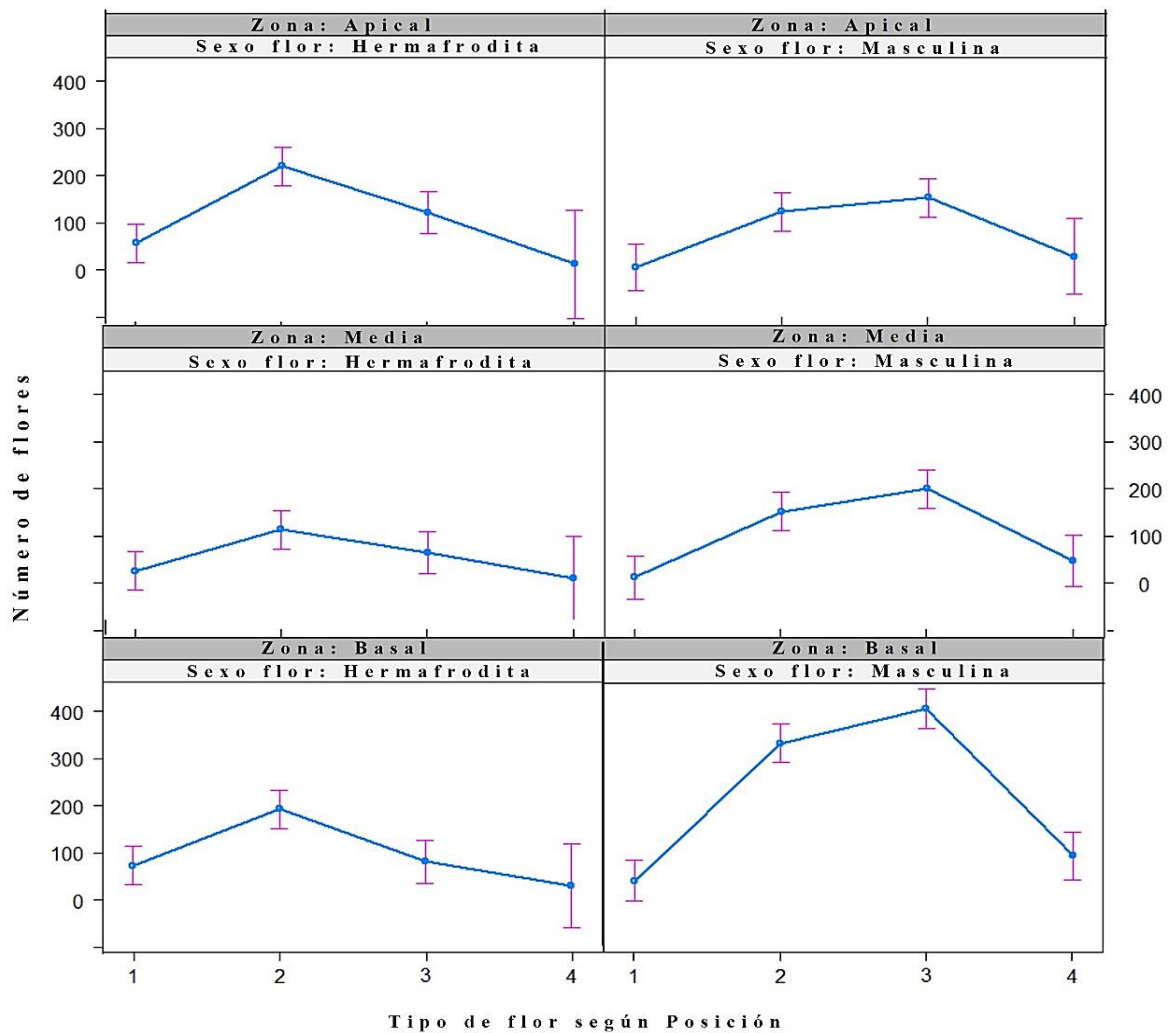


Figura 10. Distribución (medida por el número de flores) de cada sexo de flor en las diferentes zonas y posiciones de las panículas.

Morfología floral

Se evaluaron un total de 230 flores para su descripción morfológica (Figura 11). Todas las flores presentaron cinco pétalos y cinco sépalos, tres estaminoides y una antera fértil. El color de los pétalos fue amarillo claro, con coloraciones anaranjadas y rosadas en el centro del pétalo, que tornaban en rosados oscuros y violetas días posteriores a su antesis. El color del disco nectario era amarillo claro y estaba compuesto por cinco discos. El color de la antera fértil presentaba tonalidades rosáceas tras la apertura de los pétalos, que se iba oscureciendo hasta alcanzar la dehiscencia de la antera. Las flores presentaron cuatro estaminoides de colores claros.

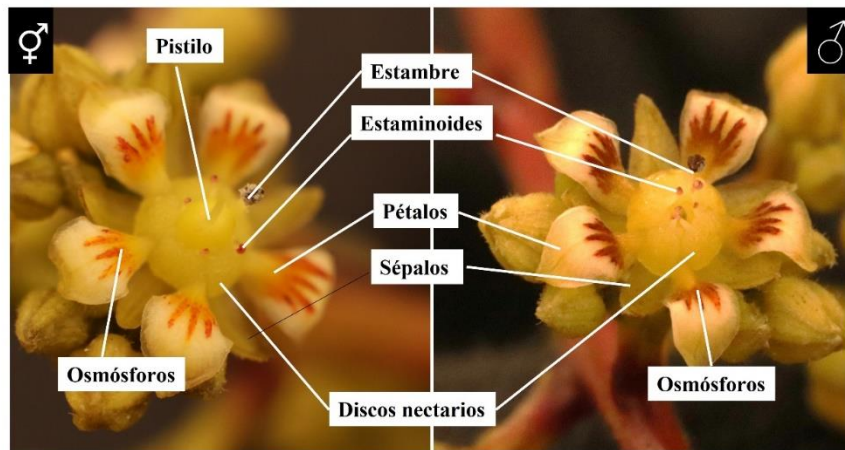


Figura 11. Flor hermafrodita (izquierda) y estamianda (derecha) de mango, indicando cada una de sus partes

El tamaño de las flores fue significativamente mayor en el caso de las flores hermafroditas, tanto para el diámetro de los pétalos ($F_{(1, 45)} = 214,20$; $p < 0,0001$), como para los discos nectarios ($F_{(1, 45)} = 62,06$; $p < 0,0001$). No se observaron diferencias en las dimensiones de las flores entre las diferentes panículas estudiadas. Las flores hermafroditas presentaban un diámetro de pétalos de 9,3 cm, y de 3,2 cm para el disco nectarario. El diámetro de los pétalos y discos nectarios en las flores estaminadas fue menor (7,9 y 2,7 cm, respectivamente).

Se encontraron efectos visibles bajo luz ultravioleta en algunas partes de la flor, tanto en hermafroditas como en estamiandas, observándose zonas donde se absorbía esta luz, y otras zonas donde se reflejaba (Figura 12).

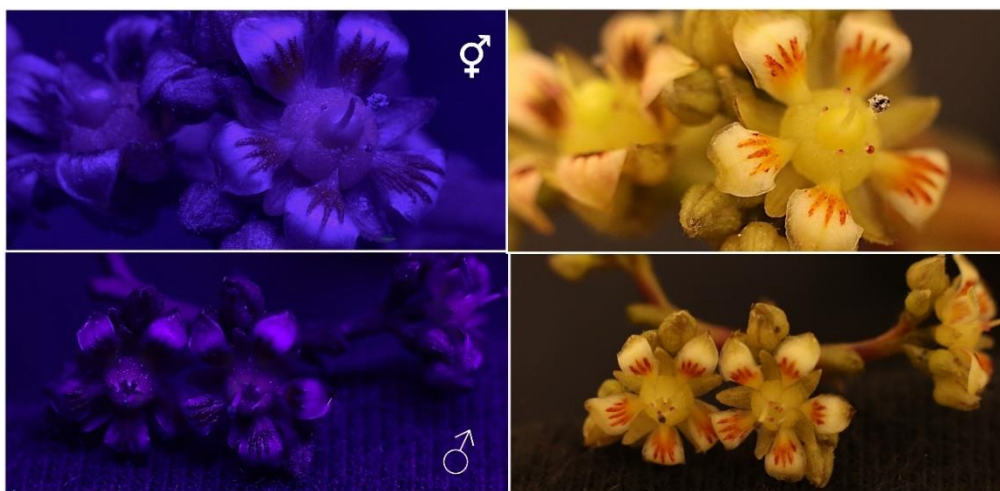


Figura 12. Flores hermafroditas (arriba) y estaminadas (abajo) de mango bajo iluminación UV (izquierda) y luz visible (derecha).

Las partes más externas de los pétalos reflejaron la luz ultravioleta, observándose fillos del pétalo con mayor brillo. La zona correspondiente a los osmóforos no reflejaba la luz. Sin embargo, se observaron pequeñas líneas y puntos brillantes junto a los discos nectarios, que podrían corresponder con las guías nectarias. Los discos nectarios aparecían con un marcado color amarillo rosáceo brillante, al igual que los granos de polen (Figura 13).

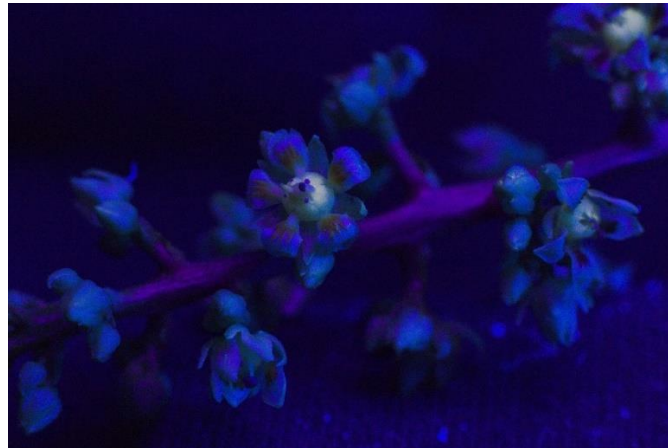


Figura 13. Inflorescencia de mango bajo luz UV.

Cuantificación de las recompensas florales de mango

El promedio de granos de polen por antera en flores hermafroditas fue de 385 y de 393 en las estaminadas. No se detectaron, por tanto, diferencias significativas en este parámetro entre las flores hermafroditas y estaminadas ($F_{(1,23)} = 1,71$; $p = 0,2050$) en ninguno de los días muestreados.

Por otra parte, el volumen de néctar por flor medido a lo largo del día en 45 flores estaminadas y 45 hermafroditas mostró que tanto el tipo de flor como la hora del día influyeron en la cantidad de néctar (Cuadro 3, Figura 15). En este sentido, las flores hermafroditas presentaron un volumen significativamente mayor, con un promedio de $0,048 \mu\text{l}$, frente a las flores estaminadas, ($0,036 \mu\text{l}$) ($t = 18,88$; $df = 172,63$; $p < 0,0001$). Además, se detectó un menor volumen de néctar durante la mañana, tanto en flores estaminadas como hermafroditas. La producción de néctar se incrementó significativamente en ambos tipos de flores a mediodía y por la tarde (Figura 14), siendo significativamente mayor para flores hermafroditas (Figura 15).

Cuadro 3. Resultados del Modelo Lineal Generalizado para la variable volúmen de néctar, para los diferentes tipos de flores, a lo largo del día (Análisis de la Devianza, tipo III).

	S. C.	G.L.	F	Pr (>F)
Tipo de flor	0,004	1	175,03	< 0,0001 ***
Hora	0,001	2	23,04	< 0,0001 ***
Tipo * Hora	0,001	2	3,87	0,022 *
Residuos	0,006	264		



Figura 14. Aparición de gotitas de néctar en el disco nectarario de flor hermafrodita de mango durante un muestreo a mediodía

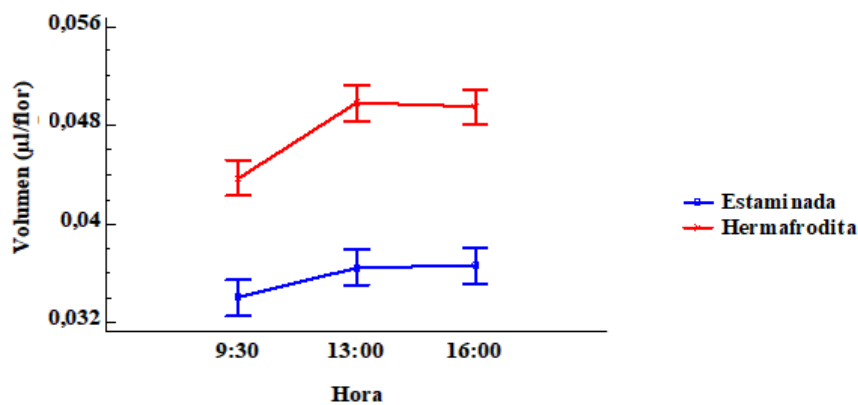


Figura 15. Evolución de la producción de néctar en las flores hermafroditas y estamiandas de mango a lo largo del día

Caracterización nutricional de las recompensas florales de mango

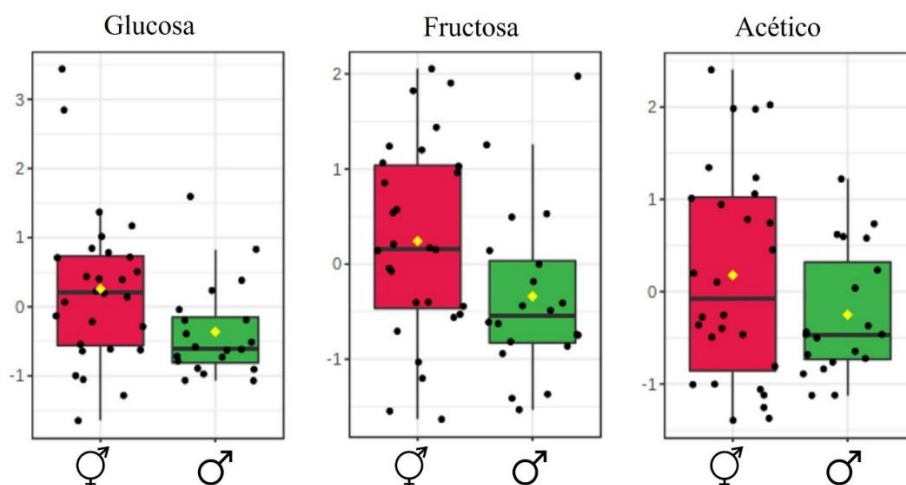
La caracterización del perfil metabólico del polen de mango registró un total de 22 metabolitos presentes en ambos tipos de flores. Los metabolitos detectados en el polen pertenecían a carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), aminoácidos (GABA,

glutamina, prolina, valina, isoleucina, leucina, treonina, alanina y fenilalanina), ácidos orgánicos (málico, fórmico, succínico, láctico, quínico), flavonoides (derivados de quercitina y miricetina) y derivados de la colina. Se encontraron también ácidos grasos.

Desde un punto de vista metabólico, no se encontraron diferencias significativas entre flores estaminadas y hermafroditas en la composición del polen contenido en las anteras ($R^2X = 0,578$; $Q^2 = 0,244$; p (CV-ANOVA) = 0,2). Se halló que el polen de flores estaminadas presentaba una mayor tendencia a incrementar la fenilalanina, ácido málico y ácido fórmico respecto a las flores hermafroditas. Por su parte, el polen en las flores hermafroditas presentaba un incremento de succinato, ácido quínico, gaba, prolina, valina, isoleucina, leucina y alanina respecto a las flores estaminadas, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en los modelos desarrollados.

Para el néctar, se identificaron 17 metabolitos en las flores hermafroditas y estaminadas. Los metabolitos del néctar de mango correspondieron a carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), aminoácidos (valina, isoleucina, leucina, alanina, glutamina y fenilalanina), ácidos orgánicos (lactato, ácido quínico, malato, piruvato, succinato, acetato y formato), y alcoholes (etanol).

Se encontraron diferencias significativas en algunos metabolitos entre flores hermafroditas y estaminadas ($R^2X = 0,70$; $Q^2 = 0,829$; p (CV-ANOVA) < 0,0001). En cuanto a carbohidratos, se observó un aumento de sacarosa en el néctar de las flores estaminadas, mientras que la glucosa y la fructosa aumentaron en el néctar de las flores hermafroditas. Además, se observó un aumento de glutamina, fenilalanina, etanol y ácido málico y fórmico en el néctar de las flores estaminadas, con respecto a hermafroditas, quienes a su vez mostraron un aumento en el nivel de ácido acético (Figura 16).



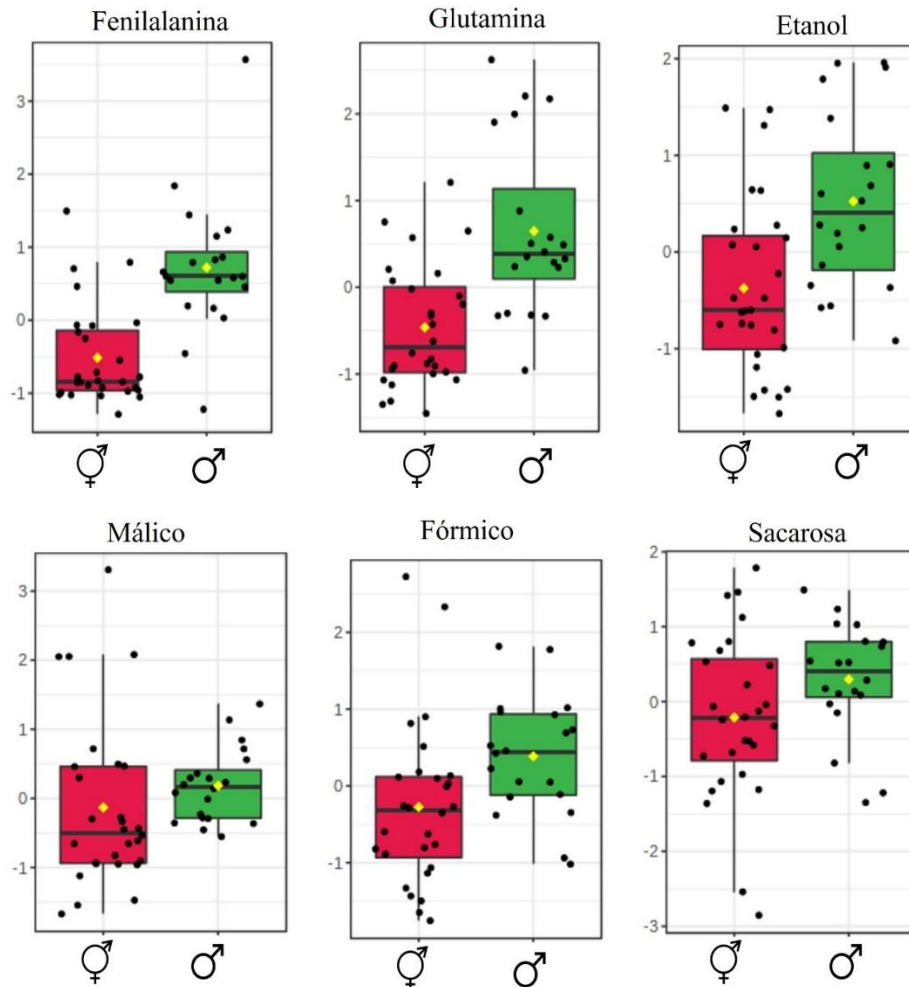


Figura 16. Boxplots de la concentración de los principales metabolitos discriminados entre flores hermafroditas y estaminadas de mango.

4. Discusión

La morfología floral de mango se presenta como panícula o tirso, con un número de flores variable (Mukherjee, 1953, 1997; Singh, 1954; McGregor, 1976; Free, 1993; Chaikiattiyos et al., 1997; Ledesma et al., 2019). En este estudio, la variedad Osteen, con árboles de aproximadamente 4 años, ha mostrado una notable variabilidad en la longitud de las panículas y en el número de flores bajo cultivo en invernadero. El número de flores estuvo relacionado de manera positiva con la longitud de la panícula, y variando en este ensayo entre 38,4 y 61,6 cm. Esta longitud está dentro del rango de las observadas en otras variedades cultivadas al aire libre, que oscilan entre 17 y 65 cm (Bally, 2006; Azam et al., 2018; Saheda et al., 2019). Respecto al número de flores, la variabilidad también ha sido pronunciada, registrándose panículas con menos de mil flores (844), frente a otras

que alcanzaban varios miles de flores (5.043). Esta diferencia entre panículas también se ha observado en otras variedades cultivadas al aire libre (Pérez, 2013).

Las inflorescencias de ‘Osteen’ en este ensayo en invernadero presentaron estructuras ramificadas de tipo I, II, III y IV, como sucede en otras variedades al aire libre (Ramírez y Davenport, 2016). Las primeras flores que alcanzaron la antesis en las panículas fueron hermafroditas, tal y como ha sido descrito por otros autores (Singh, 1954; Sukhvibul et al., 1999). Aunque la proporción de flores estaminadas y hermafroditas depende de diversos factores (Singh, 1954; Coetzer et al., 1995; Davenport, 2009; Pérez, 2013; Ledesma et al., 2019), en estas condiciones se ha observado una mayor proporción de flores estaminadas frente a hermafroditas en un 74,0% de las panículas analizadas. En el resto de las panículas se observaron proporciones equivalentes, pero nunca panículas con clara mayoría de flores hermafroditas, registrando valores máximos para estas del 58,7% (Cuadro 1).

Respecto a la ubicación de las flores dentro de la panícula, se ha observado que las flores hermafroditas ocupan principalmente zonas apicales y son de tipo I y II, frente a las flores estaminadas, cuya mayor proporción se encontró en la zona basal y eran de tipo III (Figura 10). Esta ubicación de las flores hermafroditas se corresponde con zonas con mejor conexión vascular y mayor posibilidad de desarrollar un fruto en otra especie andromonoica como el olivo (Cuevas y Polito, 2004). Esta mayor asignación de recursos provoca un mayor tamaño de las flores hermafroditas frente a las estaminadas, al igual que sucede en otros frutales andromonoicos donde el tamaño de las flores hermafroditas es mayor (Bawa y Opler, 1975; Cuevas y Polito, 2004). Asimismo, las flores hermafroditas poseen un ovario globular con estilo lateral, ausente en las flores estaminadas debido a un aborto temprano del pistilo (Bachelier y Endress, 2009).

La flor de mango es plana (discoidal) y está orientada hacia arriba y agrupada en gran cantidad en una misma unidad floral. Este tipo de inflorescencia y disposición de la flor es considerada un atractivo floral visual para polinizadores como los sírfidos (Waser, 1983; Rotheray y Gilbert, 2011). Para crear atractivos florales, algunas flores reflejan o absorben los rayos UV, mientras que otras muestran patrones UV que coinciden con partes periféricas y partes centrales de la flor que absorben los rayos UV (Silberglied, 1979). Tanto el néctar como las guías nectarías y los falsos nectaríos absorben la luz azul y UV, resultando más atractivos para los sírfidos (Lunau y Wacht, 1994; Lunau, 2000). En el caso del mango, se han documentado por primera vez bajo luz ultravioleta zonas

que reflejan y absorben esta luz, como los pétalos y los osmóforos de la flor, respectivamente (Figura 12 y 13). También se observó un mayor brillo en los filos de los pétalos, debido a la reflexión de esta luz, y que estarían relacionadas con la atracción para los polinizadores. Además, destacan estructuras llamativas, como el disco nectario y otras líneas junto a los osmóforos que aparecen más brillantes. Los polinizadores utilizan este tipo de guías para detectar las flores (Cabello et al., 2006; Lunau, 2014). En los sírfidos, no existe información suficiente sobre el sistema visual de las diferentes especies, pero algunos trabajos plantean que las diferencias interespecíficas en las visitas realizadas se deben a preferencias florales y no debidas al sistema visual de cada especie (Klecka et al., 2018).

Tanto la cantidad como la calidad de las recompensas florales influye sobre la actividad polinizadora de los visitantes de la flor (Galen y Plowright, 1985; Thomson, 1986; Harder y Thomson, 1989; Cresswell, 1999; Hunter et al., 2012). El período de apertura floral duró más de 60 días por panícula. Las panículas con mayor longevidad, con promedio de 72 días, fueron las que iniciaron su apertura más temprano, mientras que las panículas que comenzaron su apertura floral en marzo duraron menos (49 días). Esta duración de la floración fue superior al observado en otras variedades de mango al aire libre (Pérez, 2013). La apertura diaria de flores en el cultivo de mango supone una fuente constante de recursos alimenticios de polen, en la antera fértil, y de néctar, en el disco nectario presente en la base de la flor. No obstante, en las flores de mango, tanto el polen como el néctar se presentan en bajas cantidades. Esto hace que este cultivo sea poco atractivo para abejas y abejorros (Popenoe, 1917; Free y Williams, 1976; Du Toit y Swart, 1993; Usman et al., 2001; Sung et al., 2006). En el caso del polen, el promedio encontrado fue de 390 granos por flor, estando dentro de los valores determinados por otros autores, que varían entre 200 y 800 granos de polen por flor (Popenoe, 1917), sin diferencias significativas entre ambos tipos de flores, al igual que sucede en otras especies andromonoicas (Cuevas y Polito, 2004). Sin embargo, la producción de néctar sí varió según el tipo de flor y la hora del día, contrariamente a lo establecido por Siqueria *et al.* (2008), quienes observaron una producción constante de néctar de 0,045 μ l por flor. Una producción de néctar ligeramente mayor se ha detectado aquí para las flores hermafroditas (0,048 μ l) pero no en las estaminadas (0,036 μ l). Además, se ha observado una menor producción en la mañana (Figura 15). La secreción de néctar puede verse influida por los rasgos propios de la especie, el comportamiento de los polinizadores y las variables

ambientales (Dafni et al., 2005). El incremento en la producción de néctar a lo largo del día pudo deberse a las altas temperaturas y humedad relativa alcanzadas en esos momentos en el interior del invernadero (Corbet et al., 1979). Esta variación en la cantidad de néctar disponible puede provocar cambios en el forrajeo de los polinizadores que buscan néctar, esperándose una mayor actividad con su aumento.

El néctar supone la principal recompensa calorífica para los visitantes de las flores, dependiendo su valor energético del volumen y concentración de azúcares (Dafni et al., 2005; Nicolson et al., 2007). Un total de 17 metabolitos fueron detectados en el néctar de ambos tipos de flores de mango, destacando por su importancia los carbohidratos, pero también los aminoácidos, ácidos orgánicos y alcoholes. Los estudios llevados a cabo hasta el momento son escasos y sólo informan de la composición del néctar de mango entendida como la relación de sacarosa (38,49%), fructosa (30,75%) y glucosa (30,74%), ya que son los azúcares que aparecen en la mayoría de las flores (Petanidou et al., 2006; Tölke et al., 2018). Nuestros resultados muestran que las flores hermafroditas presentan mayor cantidad de glucosa y fructosa, frente a las flores estaminadas que presentan un incremento de sacarosa.

Los aminoácidos son el segundo componente más abundante del néctar y, aunque presentes a bajas concentraciones, son de gran importancia en el contexto de la ecología de la polinización. Éstos actúan como fagoestimulantes, influyendo en la atracción y nutrición, como es el caso del GABA y fenilalanina (Dafni y Kevan, 1994; Gardener y Gillman, 2002; Afik et al., 2006; Petanidou et al., 2006; Nicolson y Thornburg, 2007; Nepi, 2013). Sin embargo, algunos trabajos indican que los aminoácidos del néctar no son relevantes para las abejas, puesto que en el polen encuentran una mayor fuente de proteínas, llegando incluso a evitar las visitas a flores con altas cantidades de aminoácidos en su néctar (Baker y Baker, 1973; Fornoff et al., 2017). En este ensayo, se detectaron aminoácidos en ambos tipos de flores, destacando una mayor cantidad significativamente mayor de fenilalanina en las estaminadas.

Las proteínas son el componente nutricional más importante que contiene el polen, ya que su consumo es fundamental para el desarrollo de las crías en himenópteros y porque favorece la longevidad en sírfidos (Pinheiro et al., 2015). La composición del polen, además de proteínas, también incluye lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Day et al., 1990; Vanderplanck et al., 2014). En este ensayo, se detectaron 22 metabolitos en ambos tipos de flores, sin diferencias entre ellas. Los principales

metabolitos han sido aminoácidos y azúcares, muchos de ellos aminoácidos esenciales para los polinizadores, como es el caso de glutamina, isoleucina, leucina, prolina y valina (De Groot, 1952; Gilbert, 1985). Aunque sin diferencias significativas, un incremento de estos metabolitos fue detectado en el polen de flores hermafroditas.

Debido a la arquitectura de la inflorescencia, la morfología floral y las recompensas florales de *Mangifera indica* L., junto con los registros de los principales visitantes de sus flores en otros trabajos, se considera que el mango es una planta principalmente miofíllica (Galán-Saúco et al., 1997; Sharma et al., 1998; Dag y Gazit, 2000; Usha et al., 2014; Saeed et al., 2016; Alqarni et al., 2017; Rajan y Reddy, 2019). Estas características, junto con los numerosos informes sobre los sírfidos eristalinos como visitantes florales del mango, muestran el potencial de los mismos como polinizadores del cultivo (Anderson et al., 1982; Dag y Gazit, 2000; Sung et al., 2006; Fajardo et al., 2008; Usha et al., 2014; Kumar et al., 2016; Reddy y Sreedevi, 2016; Alqarni et al., 2017; Vishwakarma y Singh, 2017; Chauhan et al., 2018; Mohsen, 2019). La interacción planta-polinizador se iniciaría gracias al conjunto de atractivos florales del mango, con un gran número de flores en inflorescencias apicales, con colores por los que muestran preferencia los sírfidos (Waser, 1983; Lunau y Wacht, 1994; Rotheray y Gilbert, 2011; Klecka et al., 2018). Sin embargo, las señales olfativas y visuales no serían suficientes para lograr una constancia en las visitas por si solas, entrando en juego otras señales. Por ello, es necesario que, a los atractivos florales, la planta añada recompensas de utilidad al insecto. Durante el forrajeo, una quimiorrecepción del polen y del néctar intervendría en el reconocimiento y desencadenaría la ingesta de los mismos (Wacht et al., 2000), estableciéndose una relación simbiótica planta-polinizador. Por todo ello, y basado en los resultados aquí presentados, se puede esperar un alto número de visitas florales de estos insectos a las flores del mango en cultivo protegido, debido a las condiciones estables que se dan en su interior, sin que se observaran cambios importantes en su floración.

5. Bibliografía

- Abreu, A.C., Mora, S., Tristán, A.I., Martín-González, E., Prados-Pardo, Á., Moreno, M., Fernández, I. 2022. NMR-based metabolomics and fatty acid profiles to unravel biomarkers in preclinical Animal Models of Compulsive Behavior. *Journal of Proteome Research* 21: 612-622.
- Afik, O., Dag, A., Kerem, Z., Shafir, S. 2006. Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 32: 1949-1963.

- Alqarni, A., Ahmed, K., Hannan, M., Ghose, G., Munshi, J. 2017. Flies for the pollination of Greenhouse Mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) in the Subtropical Iriomote Island, Japan. *Journal of the Asiatic Society of Bangladesh, Science* 43: 135-141.
- Anderson, D., Sedgley, M., Short, J., Allwood, A. 1982. Insect pollination of mango in northern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 33: 541-548.
- Azam, K., Mir, H., Kumar, R., Ahmad, F. 2018. Study on flowering behaviour of elite mango cultivars in subtropical conditions of Bihar. *International Journal of Chemical Studies* 6(2): 2913-2917.
- Bachelier, J.B., Endress, P.K. 2009. Comparative floral morphology and anatomy of Anacardiaceae and Burseraceae (Sapindales), with a special focus on gynoecium structure and evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 499-571.
- Baker, H.G., Baker, I. 1973. Amino-acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241: 543-545.
- Bally, I.S.E. 2006. *Mangifera indica* (mango). En Elevitch, C. R. (ed.), *Traditional Trees of Pacific Islands: Their Culture, Environment and Use*, pp. 441-464. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawaii.
- Bawa, K.S., Opler, P.A. 1975. Dioecism in Tropical trees. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 29: 167-179.
- Cabello, T., Blom, J.V.D., Soler, A., López, J.C. 2006. Atractivos florales visuales en plantas hortícolas. En II Jornadas de Polinización en Plantas Hortícolas, La Mojonera, Almería.
- Chaikiattiyos, S., Pongsomboon, W., Dasanonda, M., Anupunt, P. 1997. Floral sex expression of 'Khieo Sawoei' and 'Nam Dok Mai' mangoes grown in tropical and subtropical climates in Thailand. *Acta Horticulturae* 455: 202-208.
- Chauhan, A.K., Chandra, U., Gupta, P.K. 2018. Study of pollinator's diversity on mango (*Mangifera indica* L.) var. amrapali. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6(3): 974-975.
- Coetzer, L.A., Oosthuyse, S.A., Wishart, D.L., Robbertse, P.J. 1995. Influence of pruning on the flower sex ratio in some mango cultivars. *South African Mango Growers' Association Yearbook (South Africa)* 15: 26-30.
- Corbet, S.A., Willmer, P.G., Beament, J.W.L., Unwin, D.M., Prÿs-Jones, O.E. 1979. Post-secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant, Cell & Environment* 2: 293-308.
- Cresswell, J.E. 1999. The influence of nectar and pollen availability on pollen transfer by individual flowers of oil-seed rape (*Brassica napus*) when pollinated by bumblebees (*Bombus lapidarius*). *Journal of Ecology* 87: 670-677.
- Cuevas, J., Polito, V.S. 2004. The role of staminate flowers in the breeding system of *Olea europaea* (Oleaceae): an andromonoecious, wind-pollinated taxon. *Annals of Botany* 93: 547-553.
- Dafni, A., Kevan, P. 1994. An hypothesis on complementary amino acids in nectar. *Evolutionary Theory* 10: 259-260.
- Dafni, A., Kevan, P., Husband, B. 2005. *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Ontario, Canada.
- Dag, A., Gazit, S. 2000. Mango pollinators in Israel. *Journal of Applied Horticulture* 2: 39-43.
- Davenport, T.L. 2009. Reproductive physiology. En Litz, R. E. (ed.), *The mango: botany, production and uses*, pp. 97-169. CABI, Wallingford.

- Day, S., Beyer, R., Mercer, A., Ogden, S. 1990. The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago, New Zealand. *Journal of Apicultural Research* 29: 138-146.
- De Groot, A.P. 1952. Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experientia* 8: 192-194.
- Du Toit, A.P., Swart, D.J. 1993. Pollination of mango in the Letsitele Valley during the 1992 flowering season: first report. *Yearbook South African Mango Growers' Association* 13: 129-130
- Fajardo, A., Medina, J., Opina, O., Cervancia, C. 2008. Insect pollinators and floral visitors of mango (*Mangifera indica* L. cv. Carabao). *The Philippine Agricultural Scientist* 91: 372-382.
- Fornoff, F., Klein, A.-M., Hartig, F., Benadi, G., Venjakob, C., Schaefer, H.M., Ebeling, A. 2017. Functional flower traits and their diversity drive pollinator visitation. *Oikos* 126: 1020-1030.
- Free, J.B. 1993. *Insect pollination of crops*. Academic Press, London.
- Free, J.B., Williams, I.H. 1976. Insect pollination of *Anacardium occidentale* L., *Mangifera indica* L., *Blighia sapida* Koenig and *Persea americana* Mill. *Tropical Agriculture* 53: 125-139.
- Galán-Saúco, V. 1999. *El cultivo del mango*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Galán-Saúco, V., Galván, D., Hernández Conde, J.C., Navarro, A. 1997. Preliminary studies on fruit-set of mango cultivar Tommy Atkins under greenhouse cultivation in the Canary Islands. *Acta Horticulturae* 455: 530-537.
- Galen, C., Plowright, R.C. 1985. Contrasting movement patterns of nectar-collecting and pollen-collecting bumble bees (*Bombus terricola*) on fireweed (*Chamaenerion angustifolium*) inflorescences. *Ecological Entomology* 10: 9-17.
- Gardener, M., Gillman, M. 2002. The taste of nectar - A neglected area of pollination ecology. *Oikos* 98 (3): 552-557.
- Gilbert, F.S. 1985. Diurnal activity patterns in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Ecological Entomology* 10: 385-392.
- Harder, L.D., Thomson, J.D. 1989. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants. *The American Naturalist* 133: 323-344.
- Hunter, M.D., Ohgushi, T., Price, P.W. 2012. *Effects of Resource Distribution on Animal Plant Interactions*. Academic Press Elsevier.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.
- Klecka, J., Hadrava, J., Biella, P., Akter, A. 2018. Flower visitation by hoverflies (Diptera: Syrphidae) in a temperate plant-pollinator network. *PeerJ* 6: e6025.
- Kumar, S., Joshi, P.C., Nath, P., Singh, V.K., Mansotra, D.K. 2016. Role of insects in pollination of mango trees. *International Research Journal of Biological Sciences* 5: 64-67.
- Ledesma, N., Varela, F., Algarin, F. 2019. Morphological characterization of inflorescences and flowers of 200 mango varieties (*Mangifera indica* L.). *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 131: 49-51.
- Lunau, K. 2000. The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Systematics and Evolution* 222: 89-111.
- Lunau, K. 2014. Visual ecology of flies with particular reference to colour vision and colour preferences. *Journal of comparative physiology. A Neuroethology sensory neural and behavioral physiology* 200: 497-512.

- Lunau, K., Wacht, S. 1994. Optical releasers of the innate proboscis extension in the hoverfly *Eristalis tenax* L. (Syrphidae, Diptera). *Journal of Comparative Physiology A* 174: 575-579.
- McGregor, S.E. 1976. *Insect pollination of cultivated crop plants*. United States Department of Agriculture. USA.
- Mohsen, A.M.A. 2019. Survey of insect mango pollinators and the pollination occurrence of mango trees in relations to fruit yields. *Current Science International* 8: 245-251.
- Mukherjee, S.K. 1997. Introduction: botany and importance. En Litz, R. E. (ed.), *The Mango. Botany, Production and Uses*, pp. 1-19. CAB International, Wallingford.
- Mukherjee, S.K. 1953. The mango—its botany, cultivation, uses and future improvement, especially as observed in india. *Economic Botany* 7: 130-162.
- Nepi, M. 2013. Beyond nectar sweetness: the hidden ecological role of non-protein amino acids in nectar. *Journal of Ecology* 102: 108-115.
- Nicolson, S.W., Nepi, M., Pacini, E. 2007. *Nectaries and nectar*. Springer, Dordrecht.
- Nicolson, S.W., Thornburg, R.W. 2007. Nectar chemistry. En Nicolson, S. W., Nepi, M., Pacini, E. (eds.), *Nectaries and Nectar*, pp. 215-264. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Pérez, V. 2013. *Biología reproductiva del mango (Mangifera indica L.)*. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga, Málaga.
- Petanidou, T., Van Laere, A., N. Ellis, W., Smets, E. 2006. What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos* 115: 155-169.
- Pinheiro, L.A., Torres, L.M., Raimundo, J., Santos, S.A.P. 2015. Effects of pollen, sugars and honeydew on lifespan and nutrient levels of *Episyrphus balteatus*. *BioControl* 60: 47-57.
- Popenoe, W. 1917. *The pollination of the mango*. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Raguso, R.A. 2001. Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior. En Chittka, L., Thomson, J. D. (eds.), *Cognitive Ecology of Pollination*, pp. 83-105. Cambridge University Press.
- Rajan, V.V., Reddy, P.R. 2019. A dead heat in pollination race: A comparative evaluation of the efficiency of a fly (*Chrysomya megacephala*) and a bee (*Apis florea*) in mango pollination. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 7: 1087-1091.
- Ramírez, F., Davenport, T.L. 2016. Mango (*Mangifera indica* L.) pollination: A review. *Scientia Horticulturae* 203: 158-168.
- Ramírez, F., Davenport, T.L. 2012. Reproductive Biology (Physiology)- The Case of Mango. En *Mango*, pp. 56-81. Studium Press, Houston, Texas.
- Reddy, P.V.R., Sreedevi, K. 2016. *Arthropod Communities Associated with Mango (Mangifera indica L.): diversity and interactions*. In: *Economic and ecological significance of arthropods in diversified ecosystems: sustaining regulatory mechanisms*. Springer Singapore, Singapore.
- Rotheray, G.E., Gilbert, F.S. 2011. *The Natural History of Hoverflies*. Forrest Text, Wales, UK.
- Saeed, S., Naqqash, M.N., Jaleel, W., Saeed, Q., Ghouri, F. 2016. The effect of blow flies (Diptera: Calliphoridae) on the size and weight of mangos (*Mangifera indica* L.). *PeerJ* 4: e2076.

- Saheda, M.D., Balahussaini, M., Ramaiah, M., Balakrishna, M. 2019. Study on morpho-physical characters of mango flower varieties/hybrids in Kodur agro-climatic conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8: 28-38.
- Sharma, R., Abbas, S.R., Shukia, R.P., Sharma, S. 1998. An easy and quick method of breeding flies for pollination of mango blossoms. *Insect Environment* 4: 76-77.
- Silberglied, R.E. 1979. Communication in the ultraviolet. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 373-398.
- Singh, R.N. 1954. Studies on floral biology and subsequent production of fruits in the mango (*Mangifera indica* L.) varieties Dushehari and Langra. *Indian Journal of Horticulture* 11: 69-88.
- Siqueira, K.M.M. de, Kiill, L.H.P., Martins, C.F., Lemos, I.B., Monteiro, S.P., Feitoza, E. de A. 2008. Estudo comparativo da polinização de *Mangifera indica* L. em cultivo convencional e orgânico na região do Vale do Submédio do São Francisco. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30: 303-310.
- Sukhvibul, N., Whiley, A.W., Smith, M.K., Hetherington, S.E., Vithanage, V. 1999. Effect of temperature on inflorescence development and sex expression of mono- and poly-embryonic mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74: 64-68.
- Sung, I.-H., Lin, M.-Y., Chang, C.-H., Cheng, A.-S., Chen, W.-S. 2006. Pollinators and their behaviors on mango flowers in Southern Taiwan. *Formosan Entomologist* 26: 161-170.
- Thomson, J.D. 1986. Pollen transport and deposition by bumblebees in *Erythronium*: influences of floral nectar and bee grooming. *Journal of Ecology* 74: 329-341.
- Tölke, E.D., Bachelier, J.B., de Lima, E.A., Ferreira, M.J.P., Demarco, D., Carmello-Guerreiro, S.M. 2018. Osmophores and floral fragrance in *Anacardium humile* and *Mangifera indica* (Anacardiaceae): an overlooked secretory structure in Sapindales. *AoB Plants* 10: ply062.
- Tristán, A.I., Abreu, A.C., Aguilera-Sáez, L.M., Peña, A., Conesa-Bueno, A., Fernández, I. 2022. Evaluation of ORAC, IR and NMR metabolomics for predicting ripening stage and variety in melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry* 372: 131263.
- Usha, U., Srivastava, P., Goswami, V. 2014. Diversity of floral insect visitors of mango during blooming period at Pantnagar. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 84: 363-364.
- Usman, M., Bilquees, F., Jaskani, M. 2001. Breeding in mango. *International Journal of Agriculture and Biology* 8530 (3-4): 522-526.
- Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathelet, B., Wattiez, R., Michez, D. 2014. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PLoS ONE* 9: e86209.
- Vishwakarma, R., Singh, R. 2017. Foraging behaviour of insect visitors and their effect on yield of mango var. Amrapali. *Indian Journal of Entomology* 79: 72-75.
- Wacht, S., Lunau, K., Hansen, K. 2000. Chemosensory control of pollen ingestion in the hoverfly *Eristalis tenax* by labellar taste hairs. *Journal of Comparative Physiology A* 186: 193-203.
- Waser, N.M. 1983. The adaptive nature of floral traits: Ideas and evidence. En Real, L. A. (ed.), *Pollination Biology*, pp. 241-285. Academic Press, Orlando.
- Weberling, F. 1992. *Morphology of Flowers and Inflorescences*. CUP Archive.
- Wet, E., Robbertse, P. 1986. A preliminary study of the pollen of *Mangifera indica* L. cv. Haden in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil* 3: 87-89.

**CAPÍTULO III: ACTIVITY AND FORAGING
BEHAVIOUR OF THE HOVERFLY
ERISTALINUS AENEUS (SCOPOLI, 1763) IN
PROTECTED CULTIVATION OF MANGO
(*MANGIFERA INDICA* L.)**



Sánchez, M., Velásquez, Y., González, M., & Cuevas, J. (2022). Activity and foraging behaviour of the hoverfly *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) in protected cultivation of mango (*Mangifera indica* L.). *Bulletin of Entomological Research*, 112(1), 101-109. doi:10.1017/S0007485321000717

Online submission at: www.editorialmanager.com/ber

Volume 112
Issue 1
February 2022

Bulletin of
Entomological
Research



CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

ISSN 0007-4853

Activity and foraging behaviour of the hoverfly
Eristalinus aeneus (Scopoli, 1763) in protected
cultivation of mango (*Mangifera indica* L.)M. Sánchez^{1,2} , Y. Velásquez² , M. González³ and J. Cuevas¹

Research Paper

Cite this article: Sánchez M, Velásquez Y, González M, Cuevas J (2021). Activity and foraging behaviour of the hoverfly *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) in protected cultivation of mango (*Mangifera indica* L.). *Bulletin of Entomological Research* 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0007485321000717>

Received: 5 February 2021

Revised: 1 June 2021

Accepted: 1 July 2021

Keywords:

Eristalinus aeneus; floral visits of mango crops; foraging behaviour; hoverfly pollination; pollination of protected mango crops

Author for correspondence:

M. Sánchez, Email: msanchez@polyfly.es, sanchezfernandezmanuela87@gmail.com

¹Department of Agronomy, University of Almería, ceiA3, La Cañada de San Urbano s/n, 04120, Almería, Spain; ²Polyfly S.L., Avenida de la Innovación 15, 04131, Almería, Spain and ³Experimental Station of Foundation Cajamar, Paraje Las Palmerillas 25, 04710, El Ejido, Almería, Spain

Abstract

The hoverfly *Eristalinus aeneus* is an important pollinator of crops and wild plants. However, there is a lack of detailed information about its foraging behaviour and its potential as a managed pollinator of mango. Given the growing economic importance of protected cultivation of mango, our aim is to study the flight activity and foraging behaviour of *E. aeneus* on this crop. *Eristalinus aeneus* displayed a bimodal daily activity, with peaks during mid-morning and mid-afternoon. The activity was maintained over a wide range of temperature (from 17.8 up to 37.4°C), light intensity (from 8.2 up to 57.4 klux) and relative humidity (from 19.0 up to 88.8%). The syrphids were active most of the time in this crop, and we observed five different types of activity: foraging (67%), resting (17%), flying (10%), grooming (4%) and walking (2%). This hoverfly visited hermaphrodite flowers more often than male flowers. On average, it visited 36.46 ± 13.92 flowers per 5 min, with a higher number of floral visits for nectar feeding. The duration of the visits to hermaphrodite and male flowers was similar but pollen-feeding visits lasted longer (6.44 s per flower) than nectar-feeding ones (5.51 s per flower). The highest number of visits to mango inflorescences was observed during the morning, but the longest visits occurred at midday. The implication of these results for the potential use of *E. aeneus* as a managed pollinator in protected cultivation of mango is discussed.

Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) is a tropical fruit crop belonging to the family Anacardiaceae native from Southeast Asia. In Europe, commercial production is concentrated in Southern Spain (Andalusia), either in open fields or under protected structures. There are few commercial varieties of mango in Spain, cv. 'Osteen' being the most important one. This variety is the most produced in this area because it is reliable and offers a high yield. Some varieties of mango are self-compatible, but pollen transfer to the stigma of the flower by pollinators is still needed to achieve a satisfactory fruit set (Popenoe, 1917; Singh, 1954; Free and Williams, 1976).

When blooming, mango terminal and subterminal panicles bear from a few to several hundred flowers with a variable proportion of male and hermaphrodite flowers. Mango flowers are small, ranging from 5 to 10 mm in diameter, with white, red, pink or yellow petals depending on flower age and variety (Free, 1993; Sousa *et al.*, 2010). The hermaphrodite flowers present four or five stamens, of which only one or two are fertile (Mukherjee, 1997), and a nectary shaped as a fleshy disk surrounding the ovary (McGregor, 1976). Although male flowers lack the pistil, both types of flowers offer pollen and nectar as rewards.

Under greenhouses, mango production often faces pollination deficits because wild pollinators cannot gain access to trees so easily. Unfortunately, managed pollinators commonly used in greenhouses, such as honeybees and bumblebees, are not effective in mango, because its flowers not being very attractive to them (Popenoe, 1917; Usman *et al.*, 2001). Furthermore, bees are not able to collect enough pollen and nectar for mass foraging due to the small quantity of the floral rewards in mango (Free and Williams, 1976; Du Toit and Swart, 1993; Sung *et al.*, 2006).

In order to improve mango production under protected conditions, alternative solutions based on flies are now being developed. Previous studies have demonstrated that dipterans are the main group of insects visiting mango flowers. Among them, blowflies (Calliphoridae) and hoverflies (Syrphidae) are the most frequent, suggesting these flies could help enhance mango pollination and eventually increase yields (Galán-Saúco *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1998; Dag and Gazit, 2000; Usha *et al.*, 2014; Saeed *et al.*, 2016; Alqarni *et al.*, 2017; Rajan and Reddy, 2019). Several authors have reported hoverflies foraging on mango flowers, and highlighted the presence of eristaline species such as *Eristalis tenax* (Linneo, 1758), *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763), *Eristalinus arvorum* (Fabricius, 1787),

Eristalinus hervebazini (Klocker, 1924) and *Eristalinus taeniops* (Wiedemann, 1818) (Anderson *et al.*, 1982; Dag and Gazit, 2000; Sung *et al.*, 2006; Fajardo *et al.*, 2008; Usha *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2016; Reddy and Sreedevi, 2016; Alqarmi *et al.*, 2017; Vishwakarma and Singh, 2017; Chauhan *et al.*, 2018; Mohsen, 2019).

As a first step to evaluate the potential of hoverflies for mango pollination, we studied the activity and foraging behaviour of the cristaline hoverfly *E. aeneus* in mango cultivated under plastic cover. *Eristalinus aeneus* is a cosmopolitan species belonging to the Eristalini tribe. Like other species of this tribe, adults visit flowers mainly to feed on pollen and nectar, necessary for reproduction and energy. The larvae are saprophagous and feed on microbes involved in the decay of mainly plant-based material. They are known as ‘rat-tailed maggot’ because they possess an elongated breathing tube at the end of the body that allows them to breathe while remaining underwater. They are usually found in liquid media with a large amount of organic matter such as coastal lagoons, ponds, slow-moving rivers, streams and irrigation ditches, animal dung and in sewage farms (Rotheray and Gilbert, 2011; Speight, 2011).

According to Speight (2011), this species has a homogeneous distribution in continental Europe, and can be found in anthropophilic areas in Southern Europe, while in Northern Europe its distribution is limited to coastal sites. The activity period of *E. aeneus* in Southern Europe extends from the end of March to October, with a peak in summer, and overwintering as adults (Marcos-García, 1985; Pérez-Bañón, 2000; Speight, 2011).

Understanding *E. aeneus* foraging behaviour under protected cultivation, along with the performance of efficacy trials, could allow the evaluation of its potential use as a managed pollinator in protected mango crops grown in countries where Eristalinae hoverflies are present. In this research, we studied the activity of *E. aeneus* and described its foraging behaviour and floral visits at different moments of the day, analysing floral and resources preferences (hermaphrodite vs. male flower, and nectar vs. pollen) for both male and female individuals in a protected plot of mango cv. ‘Osteen’ grown in Southern Spain.

Material and methods

The experiment was carried out in 2019 in the Cajamar Experimental Station (El Ejido, Almería, Spain), in an Inacral greenhouse covered with a three-layer non-photosensitive polyethylene plastic. Before bloom, a cultivated area of 126 m² was isolated with a white insectproof net (6 × 6 threads per cm²), enclosing six rows of 4-year-old cv. ‘Osteen’ trees. As pollinator, we used *E. aeneus* because this species tolerates high temperatures, and it was found to be the most abundant according to preliminary sampling carried in the study area in different mango varieties and other subtropical crops. After tree isolation, on 19th March, a single release consisting of the introduction of 3780 pupae of *E. aeneus* (Goldfly®, Polyfly, Spain) provided a density of approximately 30 individuals per m². Preliminary trials comparing different densities indicated that this number of insects per m² is adequate. After adult emergence finished, the pupae were sorted and counted to determine the emergence rate (95%). The sex ratio was determined from a group of pupae of the same population that were monitored in the laboratory with a 50:50 proportion (unpublished data). Observations started on 25th March and consisted of recording the daily activity of the hoverflies, foraging behaviour and visits to the inflorescences during full bloom,

three times per week during three consecutive weeks. The observation period spanned from 07:00 to 19:00 h (UTC + 1).

Daily activity of *E. aeneus* on mango

To determine the flight activity of *E. aeneus*, observations were made always from the same point in a quadrant of 1 m² located between the same two mango trees. Five minute observations were made starting at 7:00, then 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 17:00, 18:00 and 19:00 h. We recorded the number of individuals in flight at those times, as well as the start and end time to establish the duration of the monitored activity.

Temperature (°C) and relative humidity (%) were registered every 30 min by a datalogger (Inkbird IBS-TH1 Plus). Light intensity records (klux) were made using a hand digital luxmeter (Mastech MS6612) immediately after completion of the observations, and the average of 20 measurements taken in different locations was then calculated.

Foraging behaviour of *E. aeneus* on mango

To evaluate the hoverfly activity, six randomly selected individuals were tracked for 5 min during two different observation periods: in the mornings from 9:30 to 10:30 h and in the afternoons from 15:15 to 16:15 h. After the observations, we classified *E. aeneus* activities as follows: walking around panicles or leaves; grooming pollen grains attached to their body (legs, thorax, wings, head and proboscis); flying (hovering or flying in any direction); resting statically; and foraging when the syrphid flies extended their proboscis and came into contact with the anthers or the nectariferous disc of the flowers during no less than 2 s. The duration of each activity was recorded. The time spent grooming, walking, flying and feeding was considered active time, i.e. creating an opportunity for pollen transport, while resting was determined as a period of inactivity. During foraging, the number and duration of floral visits made by each individual were recorded, making a distinction between the sex of the flower (male vs. hermaphrodite) and the type of resource collected.

Inflorescence mango visits

Five panicles randomly selected from different trees were observed each day for 5 min during the morning (8:30–9:30 h), midday (12:30–13:30 h) and afternoon (16:30–17:30 h). We recorded the number of *E. aeneus* visiting the panicles, the duration of the visits, the part of the panicle visited (basal, middle or apical portion) and the sex of the insect that made the visit. The panicle visitation rate was calculated as the number of visits per panicle per 5 min.

Data analyses

Data analyses were performed using R Statistical Software (R-Core Team, Vienna, Austria, version 4.0.2). Diurnal activity of *E. aeneus* was evaluated using a Linear Mixed-Effects Model (LMM) with the ‘lme4’ and the ‘lmerTest’ packages (Bates *et al.*, 2015; Kuznetsova *et al.*, 2017). The number of flies on flight was square-root transformed and included as the response variable. The time of the day was included as a fixed effect and the date of observation as a random effect. The conditional R² (R²c) was calculated as a metric of model quality with ‘MuMIn’ package (Barton, 2020). The effects of abiotic variables on the activity of *E. aeneus* were evaluated over two distinct periods: from mornings to afternoons (7:00–14:00 h)

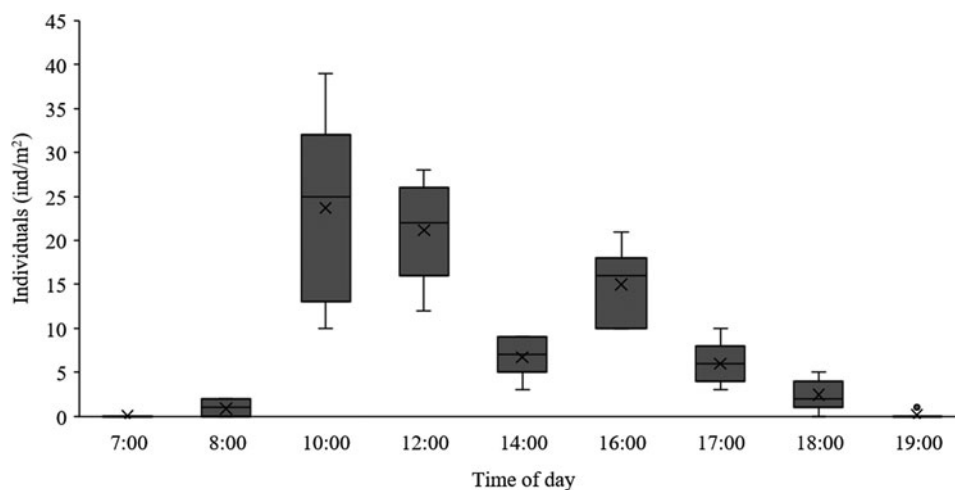


Figure 1. Boxplots representing the ranges of individuals per m^2 of *Eristalinus aeneus* on flight related to the time of the day.

and from afternoons to evenings (14:00–19:00 h). The selection of these periods was based upon the overall patterns of flight activity previously observed. A generalized linear mixed-effect model (GLMM) with ‘MASS’ package (Venables and Ripley, 2002) was used, since the response variables have a negative binomial distribution (‘glm.nb’ function). The variables included in the model were temperature, light intensity and relative humidity. The final model was selected by comparing the Akaike Information Criterion (AICc) with the values of the full model. To ensure no violation of the normality and homoscedasticity assumption of the residuals, all models were graphically inspected with quantile-quantile plots (Q-Q plots) and histogram graphics.

To compare the time spent for every activity throughout the day and during each period of the day, Kruskal–Wallis and χ^2 tests were performed. Floral visits were also analysed with Goodness-of-fit, Kruskal–Wallis and χ^2 tests to determinate possible floral preferences (male vs. hermaphrodite), duration of floral visits and type of rewards collected (pollen vs. nectar).

Finally, Kruskal–Wallis test was used to determine whether differences in the number and duration of panicle visits by *E. aeneus* existed, comparing mornings, middays and afternoons. The χ^2 tests were also used to determine differences between panicle visit rates and duration of the visits, according to the section of the panicle. The proportion of female and male flies visiting each mango panicle was compared using a one-sample proportions test.

Results

Daily activity of *E. aeneus* on mango

Flight activity of *E. aeneus* was positively correlated with the time of the day ($F_{5,43} = 37.204$, $P < 0.001$, $R^2_c = 0.78$). This hoverfly showed a bimodal daily activity pattern with two peaks of flight activity, and substantial variations in the number of individuals in flight throughout the day (fig. 1). The activity started early in the morning (between 7:00 and 8:00 h) and decreased after midday. The first peak of activity occurred at 10:00 h with an average of 27 individuals per m^2 in flight (SE = 2.98). A clear decrease in *E. aeneus* activity was observed during the hottest hours of the day (14:00 h) (fig. 1). In the afternoon, the activity increased again to a certain extent, reaching a second peak around 16:00 h with an average of 15 individuals per m^2 in flight (SE = 1.43). The activity

of the majority of syrphid flies stopped between 18:00 and 19:00 h (fig. 1). *Eristalinus aeneus* flies were active for approximately 11 h throughout the day. The maximum number of syrphids per m^2 observed was 39 and the minimum zero.

The activity of *E. aeneus* and environmental variables changed as the day progressed and they were correlated (fig. 2). Light intensity showed a unimodal pattern with a peak of 47.22 klux in the early afternoon (14:00 h). Temperature increased steadily from 15.3°C in the morning to 32.3°C at midday, remaining high until mid-afternoon (17:00 h) after which it decreased to 22.9°C. Humidity conditions varied inversely to light intensity and temperature, reaching a minimum value of 32.4% at 14:00 h. The drop in *E. aeneus* activity observed in early afternoon (14:00 h) coincided with the peak in temperature and light intensity, as well as with the lower values of relative humidity. *Eristalinus aeneus* continued to be active, with a minimum of ten individuals per m^2 in high ranges of temperature, light intensity and humidity: 17.78–37.36°C; 8.20–57.41 klux and 18.98–88.77%, respectively.

The effects of the environmental factors on the bimodal activity pattern of *E. aeneus* seemed different depending on the time of the day. The significant variables for both periods are shown in table 1. The model for the first period (7:00–14:00 h) shows that the activity of the flies was significantly associated with temperature and light intensity. However, for the second part of the day (14:00–19:00 h), the significant variables were light intensity and relative humidity. Light intensity was the most important variable influencing the overall activity of *E. aeneus* throughout the day (table 1).

Foraging behaviour of *E. aeneus* on mango flowers

Most of the syrphid flies activities we observed took place around mango trees. Different interactions were detected among individuals, such as territorial aggressions between males or males hovering around females seeking to copulate with them. During midday hours, the hoverflies sought shelter among the flowers of the panicles or under the mango leaves. Moreover, gregarious groups were observed during the moments of inactivity in the course of sunset.

The time spent by each individual for the different activities is presented in fig. 3. A total of 80 individuals were observed, 40

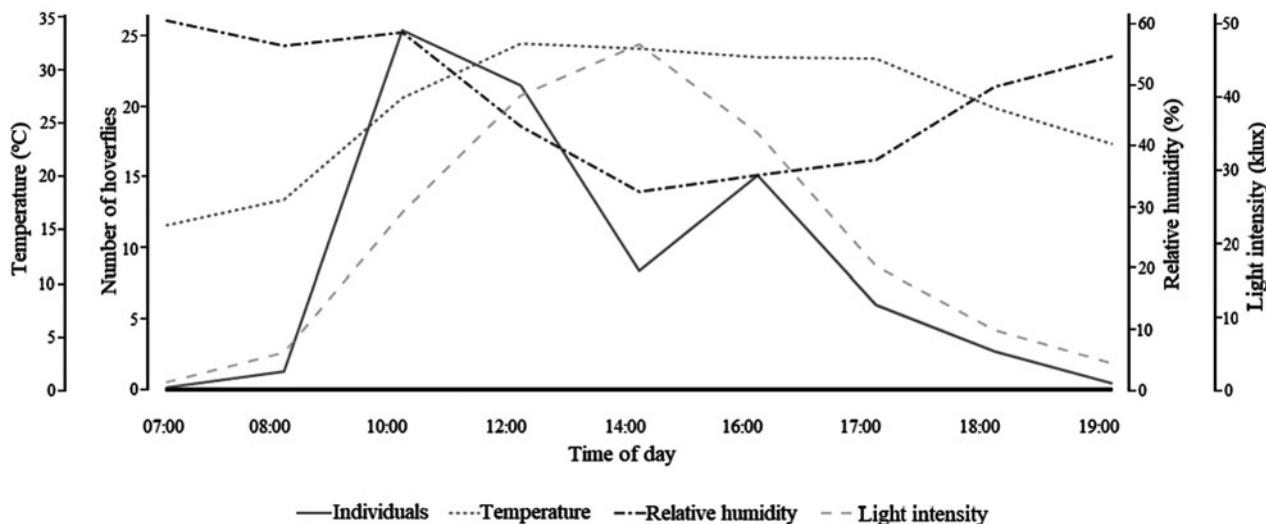


Figure 2. Number of hoverflies in relation to environmental variables for each time of the day during the observation period.

Table 1. GLMM model of *E. aeneus* activity during two periods of the day and interactions with environmental factors

Coefficients	Estimate	Std. Error	z value	P value
<i>Morning-afternoon model</i>				
Initial model morning-afternoon, AIC = 246.75; final model morning-afternoon, AIC = 205.46				
Intercept	-8.251	2.425	-3.403	0.000
Temperature	0.421	0.087	4.860	0.000
Light intensity	0.179	0.040	4.461	0.000
Relative humidity	0.063	0.033	1.904	0.057
Temp × L. intensity	-0.008	0.001	-6.476	0.000
L. intensity × RH	0.002	0.000	3.704	0.000
Temp × RH	-0.003	0.001	-2.801	0.005
<i>Afternoon-evening model</i>				
Initial model afternoon, AIC = 222.18; final model afternoon-evening, AIC = 192.54				
Intercept	-1.287	0.498	-2.585	0.010
Light intensity	0.176	0.021	8.424	0.000
Light intensity ²	-0.002	0.000	-7.543	0.000
Relative humidity	0.019	0.006	2.985	0.003

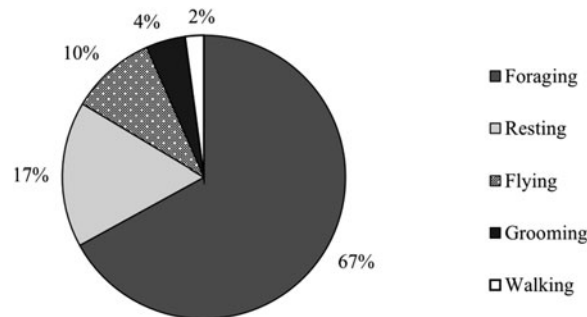


Figure 3. Time spent (%) in each activity by *E. aeneus* during observations.

during the morning and 40 during the afternoon; 4355 records were registered, 2918 of them were flies visiting flowers, 723 flights, 426 resting, 195 walking and only 93 were records of grooming. The percentage of time the syrphids spent in these activities was significantly different than an expected equal distribution, showing a bias towards feeding ($\chi^2 = 240.020$, $df = 4$, $P < 0.001$). The percentage of active time during the day was 83% while only 17% was resting (fig. 3).

The syrphid flies were active most of their time, both in the mornings and in the afternoons (85.91 vs. 82.30%). The time assigned to the different tasks was similar along the day ($\chi^2 = 1.533$, $df = 4$, $P = 0.821$). Foraging and flying took slightly longer

in the mornings, while walking, grooming and resting lasted longer in the afternoons (morning vs. afternoon: 68.32 vs. 64.57% foraging; 9.90 vs. 6.98% flying; 14.09 vs. 17.70% resting; 2.55 vs. 3.69% walking; and 5.14 vs. 7.06% grooming).

Regarding the main activity in terms of facilitating potential mango pollination, foraging of *E. aeneus* occurred in both hermaphrodite and male flowers, feeding on pollen as well as on nectar in both types of flowers. Foraging movements were clearly detected and constituted the most recurrent activity for all individuals. When *E. aeneus* was observed foraging, we noticed several extensions of the proboscis in each type of flower, around the five nectary discs. The majority of proboscis extensions were directed towards the fertile anther, ignoring the four atrophied anthers lacking pollen. Also, when feeding, *E. aeneus* made visits in all directions on the panicle, on different panicles of the same tree or different trees. The number of flowers visited during the observations was on average 36.46 ± 13.92 flowers per 5 min. Hermaphrodite flowers appeared to attract more visits than male flowers (53.87 vs. 46.13%). Since male flowers are by far more abundant in the inflorescence of this cultivar (85 vs. 15% for male and hermaphrodite flowers, respectively) (unpublished data), a strong preference for hermaphrodite flowers is deduced ($\chi^2 = 3458.300$, $df = 1$, $P < 0.001$).

The pattern of floral visits on hermaphrodite and male flowers remained unchanged throughout the day ($\chi^2 = 0.159$, $df = 1$, $P = 0.691$). *Eristalinus aeneus* made an average of 38.45 ± 15.47 visits per 5 min during the morning, with a comparatively

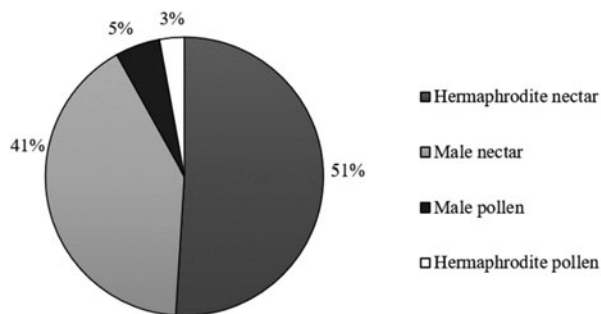


Figure 4. Floral reward (%) taken on each type of flower by *E. aeneus*.

higher rate on hermaphrodite flowers (21.52 ± 8.87 flowers) than on male flowers (16.93 ± 11.96 flowers). In the afternoon, the average number of flowers visited by *E. aeneus* was 34.26 ± 11.81 visits per 5 min, with 17.58 ± 8.29 visits to hermaphrodite flowers, and 16.68 ± 10.89 to male flowers. With regard to duration, the time spent was similar in both types of flowers (5.66 vs. 5.49 s, for hermaphrodite and male flowers, respectively) ($\chi^2 = 3.116$, $df = 1$, $P = 0.08$). The duration of the visits was not affected by the time of the day or by the sex of the flower ($\chi^2 = 0.005$, $df = 1$, $P = 0.944$), although it was slightly longer in the afternoons than in the mornings (hermaphrodite flowers: 5.77 vs. 5.58 s; male flowers: 5.76 vs. 5.25 s).

Major differences in the type of rewards taken from the different kinds of flowers were found and are presented in fig. 4, being nectar the most sought-after resource in both male and hermaphrodite flowers (91.9 vs. 8.1%, for nectar and pollen, respectively) ($\chi^2 = 34.525$, $df = 1$, $P < 0.001$). On the contrary, the time spent feeding on pollen was longer than the time consumed seeking nectar (6.44 and 5.51 s per flowers, respectively) ($\chi^2 = 5.659$, $df = 1$, $P = 0.017$).

The foraging pattern did not change between mornings (nectar: 90.8%; pollen: 9.2%) and afternoons (nectar: 94.6%; pollen: 5.41%) ($\chi^2 = 1.043$, $df = 1$, $P = 0.307$), and the preference for nectar always remained more pronounced. The time *E. aeneus* dedicated to feeding on pollen and nectar was similar during the mornings and afternoons ($\chi^2 = 0.016$, $df = 1$, $P = 0.901$). However, nectar feeding took longer during the afternoons (5.73 vs. 5.32 s). On the contrary, slightly longer pollen feeding time was observed in the mornings (6.50 vs. 6.32 s).

With regard to the behaviour of female and male individuals of the syrphid population, we observed some differences between sexes. On one hand, females and males behaved differently in terms of time spent on each activity. On the other hand, the behaviour of both sexes somewhat changed throughout the day (Sánchez *et al.*, in prep.). Nonetheless, in all cases, the most common and lasting activity for both sexes was foraging.

Inflorescences mango visits

During monitoring, a total of 335 visits of *E. aeneus* over 110 mango panicles were registered in 5 min observations. Visitation rate was 3.03 ± 1.56 visits per panicle per 5 min, with a minimum of 1 visit and a maximum of 8 visits per 5 min, being 2 visits per panicle the most frequent rate. The duration of the inflorescence visits ranged from 2 to 300 s, with an average of 133.79 ± 102.29 s. It is important to mention that the duration of some visits exceeded the time limit established for the observations (300 s). Therefore, the real duration of those visits was not established.

The time of the day had no significant effect on the number and duration of the visits received by mango panicles. The number of visits was, however, slightly higher in the morning followed by middays and afternoons (3.49, 2.85 and 2.77 panicles per 5 min, respectively) ($\chi^2 = 3.819$, $df = 2$, $P = 0.148$). Regarding the duration of the visits, they were a little longer in the afternoons, followed by middays and mornings (140.32, 132.00 and 129.75 s per panicle, respectively) ($\chi^2 = 1.460$, $df = 2$, $P = 0.482$) (fig. 5).

The number and duration of the visits made by *E. aeneus* were different depending on the portion of the panicle. Thus, the number of visits to the apex was significantly higher compared to the middle and basal portions (1.72, 0.92 and 0.42 visits per panicle portion per 5 min, respectively) ($\chi^2 = 69.141$, $df = 2$, $P < 0.001$). Conversely, the duration of the visits followed an opposite trend and was significantly longer in the basal portion followed by the middle and apical portions (169.40, 142.49 and 120.54 s per panicle zone, respectively) ($\chi^2 = 8.879$, $df = 2$, $P = 0.012$) (fig. 6).

Finally, we observed significant differences in the number and duration of the visits depending on the sex of the hoverflies. Males were more frequent visitors than females (59.10 vs. 40.90% visits) ($\chi^2 = 11.107$, $df = 1$, $P < 0.001$), although the duration of females' visits was longer ($\chi^2 = 43.950$, $df = 1$, $P < 0.001$) (fig. 7).

Discussion

Eristalinus aeneus aptitude as pollinator of mango

The potential of an insect species as an effective pollinator is primarily determined, among other factors, by its foraging behaviour (Rader *et al.*, 2009; Ne'eman *et al.*, 2010). Unfortunately, detailed information about the behaviour of hoverflies is scarce and mostly limited to aphidophagous species (Wratten *et al.*, 1995; Soleyman-Nezhadiyan and Laughlin, 1998; Emtia and Ohno, 2018; Rodriguez-Gasol *et al.*, 2019; Pekas *et al.*, 2020). Therefore, there is a clear gap in the knowledge of the aptitude of dipterans as pollinators, especially when confined within protected cultivation structures. Our study provides, for the first time, solid information about the activity and foraging behaviour of the hoverfly *E. aeneus* in mango crops under the challenging environmental conditions imposed by plastic greenhouses.

Contrary to what de Siqueira *et al.* (2008) proposed for other dipterans, *E. aeneus* visits both types of flowers, although we have detected a preference for hermaphrodite flowers and for nectar as a reward (fig. 4). This is in line with observations carried out in Australia and Philippines (Anderson *et al.*, 1982; Fajardo *et al.*, 2008), even though several authors reported that dipterans only feed on nectar, while bees and bumblebees reportedly feed on both pollen and nectar (Dag and Gazit, 2000; Sung *et al.*, 2006; de Siqueira *et al.*, 2008; Souza and Halak, 2009; Vasanthakumar *et al.*, 2018; Usha and Srivastava, 2018).

Since the mango panicles contain hundreds of flowers, and the tree has numerous panicles, a high visitation rate and efficient floral visits are important to achieve successful pollen transfer. In our study, *E. aeneus* carried out a high number of visits to mango flowers (7.2 visits per min), similar to *Apis cerana* and *Apis mellifera* (7.3 and 8.9 visits per min, respectively) in open field (Dag and Gazit, 2000; Deuri *et al.*, 2018). The available information on visits of wild dipterans is difficult to compare because it is highly variable and, in many cases, insects are not identified at species level. For instance, Dag and Gazit (2000) reported a low activity for *E. aeneus* (2.1 visits per min) and higher visits rate for Calliphoridae and Sarcophagidae (9.7 and 13.6 visits per min, respectively), while Huda *et al.* (2015) recorded different visits

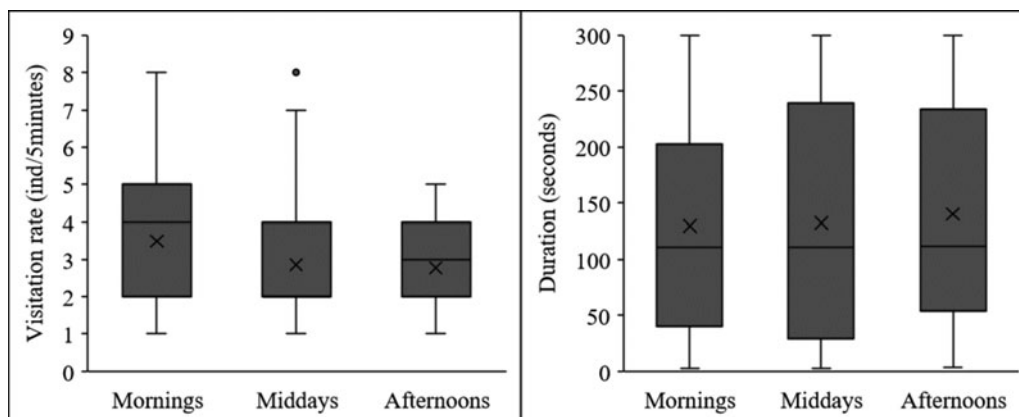


Figure 5. Boxplots representing the ranges of the visitation rate (left) and duration of visits in mango panicles (right) during each day period. Five minutes observations.

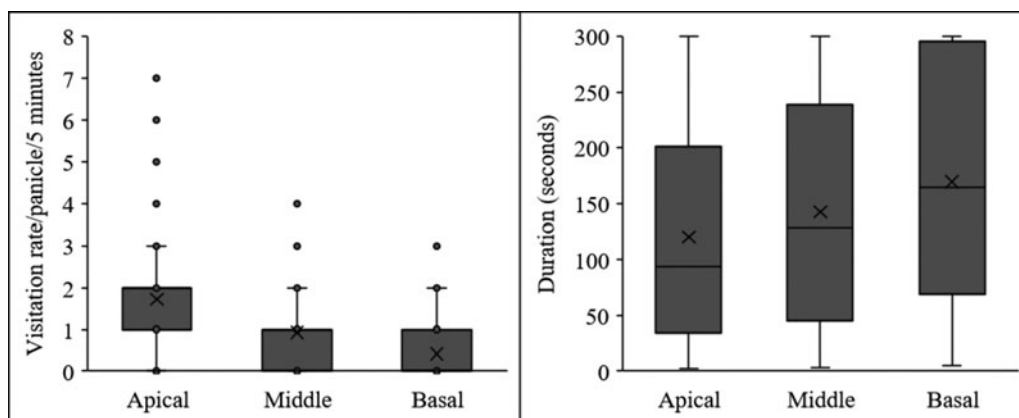


Figure 6. Boxplots representing the ranges of the visitation rate (left) and duration (right) of hoverflies to the different portions of mango panicles. Five minutes observations.

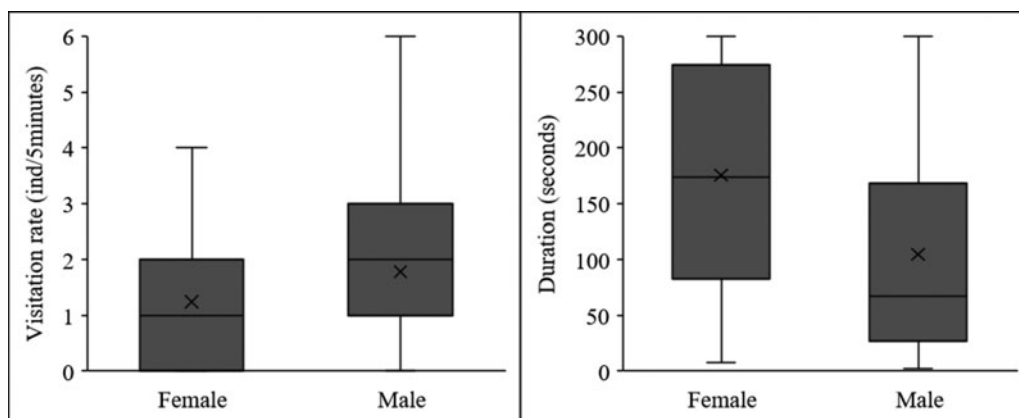


Figure 7. Boxplots representing the ranges of the visitation rate (left) and duration of visits (right) to mango panicles by females vs. males of *E. aeneus*. Five minutes observations.

rate for *Sarcophaga*, *Stomorhina* and *Chrysomya* (3.1, 4.2 and 7.0 visits per min, respectively).

Moreover, frequent visits to different panicles were also confirmed. We found that the rate of visits to the inflorescences by *E. aeneus* (36 visits per h) (fig. 6) was much higher than with other dipteran or hymenopteran pollinators in open field

such as *Chrysomya*, *Apis indica* and *Tetragonula* (5.9, 6.4 and 11.5 visits per h, respectively) (Munj *et al.*, 2017).

The time *E. aeneus* spent visiting flowers for nectar and pollen foraging was 5.5 and 6.4 s, respectively. These results are in line with the records of other pollinators. According to different studies, the duration of flower visits performed by wild dipterans

such as *Chrysomya*, *Sarcophaga*, *Stomorphina* and *Musca domestica* varied from 5 to 33.1 s whereas hymenopteran records indicated floral visits lasting between 2 and 8 s (Sung *et al.*, 2006; Souza and Halak, 2009; Kumar *et al.*, 2012).

In our experiment, most *E. aeneus* were observed landing in the most external and apical portions of the panicles (fig. 6). Easier access to the apex of the panicle explains this pattern. After landing, we observed that the syrphids hovered over terminal flowers across different ramifications of the panicle, and hopped on to another panicle branch, as this is the case with other pollinators (Fajardo *et al.*, 2008). This pattern also explains the proportionally higher number of visits to hermaphrodite flowers reported here, since it is common to see a greater number of this type of flowers in the apex of the panicle (Singh, 1954; Sukhvirul *et al.*, 1999). Meanwhile, when visiting flowers in the basal portion of the inflorescence, the syrphids took more time for each visit. Indeed, hovering to these zones is more difficult, which results in less frequent interactions between individuals. Thyselius *et al.* (2018) found that *Eristalis* hoverflies activate a scape response (leaving the flower) when approached by another insect, therefore in the basal portion of the panicle with less competitors, hoverflies remain longer exploiting the food resources.

With regard to the behaviour of *E. aeneus*, we observed five main activities: foraging, resting, flying, grooming and walking. According to Gilbert (1985), syrphids of the tribe Eristalini dedicate more time to foraging (between 73.7 and 84.5% depending on the species), compared to other syrphids. In our study, *E. aeneus* spent an average of 67% of its time foraging, followed by the times spent resting and flying (fig. 3). We also observed territorial fights between males and copulations with females. Other studies have reported territoriality in other species of the Eristalini tribe (Wellington and Fitzpatrick, 1981), but such behaviour had never been observed before for *E. aeneus*.

Different authors have confirmed the capacity to transport pollen of eristaline syrphids in mango (Jiron and Hedström, 1985; Huda *et al.*, 2015; Usha and Srivastava, 2018). We observed that when foraging on the flowers, the body of the hoverflies, mainly the thorax and abdomen sections, came into contact with the fertile anther of the flower. This contact is what typically enables the transport of pollen as it is observed with other pollinators in mango (Anderson *et al.*, 1982; Fajardo *et al.*, 2008; de Siqueira *et al.*, 2008; Huda *et al.*, 2015).

Environment and food availability effects on *E. aeneus* behaviour

Pollinator behaviour throughout the day can be affected by environmental factors and food resource availability (Szabo, 1980; Sihag and Abrol, 1986; Comba, 1999; Innouye *et al.*, 2015). In our study, *E. aeneus* remained active for approximately 11 hours a day, as observed in open field plantations (Souza and Halak, 2009). We observed that the activity followed a bimodal pattern, and although this species tolerates high temperatures, its activity is reduced at midday, as it is the case with other dipterans (Willmer, 1983; Gilbert, 1985; Herrera, 1990; Ssymank, 1991, 2001). During the morning, the most important environmental variables influencing the flying activity of *E. aeneus* were temperature and light intensity, while light intensity and relative humidity appeared to be the most important variables during the second part of the day. Deuri *et al.* (2018) observed that the activity of dipterans in mango was negatively associated with temperature and positively associated with relative humidity on cloudy or

sunny days. In the case of bees of the genus *Apis*, several studies have shown positive correlations with light intensity and temperature, but negative with humidity (Szabo, 1980; Sihag and Abrol, 1986; Deuri *et al.*, 2018).

The bimodal activity observed in *E. aeneus* appears to be common in other syrphids (Herrera, 1990) but differs from hymenopterans and other dipterans observed in open field mangoes that show only a morning peak (Anderson *et al.*, 1982; Sung *et al.*, 2006; Fajardo *et al.*, 2008; Souza and Halak, 2009; Kumar *et al.*, 2012; Vishwakarma and Singh, 2017; Deuri *et al.*, 2018). These patterns also seem to be related to pollen availability and nectar secretion which vary throughout the day due to changes in temperature and humidity (Corbet *et al.*, 1979). Pollen availability in mango is at its highest early in the morning when the anther dehiscence begins (Mallik, 1957; Singh, 1960), then it gradually decreases as the day progresses (Mukherjee, 1953; de Siqueira *et al.*, 2008; Souza and Halak, 2009; Bally *et al.*, 2009). On the other hand, nectar is equally available throughout the day (de Siqueira *et al.*, 2008; Souza and Halak, 2009). Therefore, hymenopterans that are more specialized in pollen foraging are more active in the mornings, whilst *E. aeneus*, which mainly forages nectar, remain active for a longer period, making frequent floral visits even in the afternoons.

The use of managed pollinators in protected crops presupposes their readiness to adapt to the extreme conditions of greenhouses, such as high temperatures and low humidity. Some authors describe how these extreme environmental conditions could reduce the activity, foraging and survival of bees and bumblebees (Heinrich, 1974, 1980; Gaye *et al.*, 1991; Sabara and Winston, 2003; Kwon and Saeed, 2003; Hedtke *et al.*, 2011; Morimoto *et al.*, 2011; Abrol, 2012; Simon-Delso *et al.*, 2014). In our experiment, *E. aeneus* kept a significant activity level over a wide range of temperatures, light intensity and humidity conditions. Ongoing studies on its pollination efficiency, resulting fruit set and fruit quality seek to establish suitable protocols for the management of *E. aeneus* as a pollinator of protected mango and other subtropical crops.

Acknowledgements. This study is part of a PhD project supported by the Ministry of Innovation and Science of Spain that co-financed the contract to M. Sánchez (DI-17-09575: Predoctoral grant for research training in companies 'Industrial Doctorates').

Conflict of interest. One author is employed by the company. Another author owns shares and is on the Board of the company.

References

- Abrol DP (2012) *Pollination Biology: Biodiversity Conservation and Agricultural Production*. Dordrecht: Springer.
- Alqarni A, Ahmed K, Hannan M, Ghose G and Munshi J (2017) Flies for the pollination of greenhouse mango (*Mangifera Indica* L., Anacardiaceae) in the subtropical Iriomote Island, Japan. *Journal of the Asiatic Society of Bangladesh* 43, 135–141.
- Anderson D, Sedgley M, Short J and Allwood A (1982) Insect pollination of mango in northern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 33, 541–548.
- Bally ISE, Lu P and Johnson PR (2009) Mango breeding. In Jain SM and Priyadarshan PM (eds), *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical species*. NY: Springer, pp. 51–82.
- Barton K (2020) MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17. Available at <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn> (Accessed 26 January 2021).
- Bates D, Mächler M, Bolker B and Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1–48.

- Chauhan AK, Chandra U and Gupta PK** (2018) Study of pollinator's diversity on mango (*Mangifera indica* L.) var. Amrapali. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**, 974–975.
- Comba L** (1999) Patch use by bumblebees (*Hymenoptera apidae*): temperature, wind, flower density and traplining. *Ethology Ecology & Evolution* **11**, 243–264.
- Corbet SA, Willmer PG, Beament JW, Unwin DM and Prýs-Jones OE** (1979) Post-secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant, Cell & Environment* **2**, 293–308.
- Dag A and Gazit S** (2000) Mango pollinators in Israel. *Journal of Applied Horticulture* **2**, 39–43.
- de Siqueira KMM, Kiill LHP, Martins CF, Lemos IB, Monteiro SP and Feitoza EdA** (2008) Estudo comparativo da polinização de *Mangifera indica* L. em cultivo convencional e orgânico na região do Vale do Submédio do São Francisco. *Revista Brasileira de Fruticultura* **30**, 303–310.
- Deuri A, Rahman A, Gogoi J, Borah P and Bathari M** (2018) Pollinator diversity and effect of *Apis cerana* F. pollination on yield of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**, 957–961.
- Du Toit AP and Swart DJ** (1993) Pollination of mango in the Letsitele Valley during the 1992 flowering season: first report. *Yearbook South African Mango Growers' Association* **13**, 129–130.
- Emtia C and Ohno K** (2018) Foraging behavior of an aphidophagous Hoverfly, *Sphaerophoria macrogaster* (Thomson) on insectary plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **21**, 323–330.
- Fajardo A, Medina J, Opina O and Cervancia C** (2008) Insect pollinators and floral visitors of mango (*Mangifera indica* L. cv. Carabao). *The Philippine Agricultural Scientist* **91**, 372–382.
- Free JB** (1993) *Insect Pollination of Crops*. London: Academic Press.
- Free JB and Williams IH** (1976) Insect pollination of *Anacardium occidentale* L., *Mangifera indica* L., *Blighia sapida* Koenig and *Persea americana* Mill. *Tropical Agriculture* **53**, 125–139.
- Galán-Saúco V, Galván D, Hernández Conde JC and Navarro A** (1997) Preliminary studies on fruit-set of mango cultivar Tommy Atkins under greenhouse cultivation in the Canary Islands. *Acta Horticulturae* **455**, 530–537.
- Gaye MM, Maurer AR and Seywerd FM** (1991) Honey bees placed under row covers affect muskmelon yield and quality. *Scientia Horticulturae* **47**, 59–66.
- Gilbert FS** (1985) Diurnal activity patterns in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Ecological Entomology* **10**, 385–392.
- Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB and Genersch E** (2011) Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**, 167–173.
- Heinrich B** (1974) Thermoregulation in bumblebees. *Journal of Comparative Physiology* **88**, 129–140.
- Heinrich B** (1980) Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera*: II. Regulation of thoracic temperature at high air temperatures. *Journal of Experimental Biology* **85**, 73–87.
- Herrera CM** (1990) Daily patterns of pollinator activity, differential pollinating effectiveness, and floral resource availability, in a summer flowering Mediterranean shrub. *Oikos* **58**, 277–288.
- Huda AN, Salmah MRC, Hassan AA, Hamdan A and Razak MNA** (2015) Pollination services of mango flower pollinators. *Journal of Insect Science (Online)* **15**, 113.
- Innouye DW, Larson BMH, Szymank A and Kevan PG** (2015) Flies and flowers III: ecology of foraging and pollination. *Journal of Pollination Ecology* **16**, 115–133.
- Jiron LF and Hedstrom I** (1985) Pollination ecology of mango (*Mangifera indica* L.) (Anacardiaceae) in the neotropic region. *Turrialba* **35**, 269–277.
- Kumar P, Baskaran S, Sundaravidevelan C, Kuberan T and Anburaj J** (2012) Influence of environmental factors on insect pollination activity of *Mangifera indica* Linn. *Asian Journal of Plant Science and Research* **2**, 692–698.
- Kumar S, Joshi PC, Nath P, Singh VK and Mansotra DK** (2016) Role of insects in pollination of mango trees. *International Research Journal of Biological Sciences* **5**, 64–67.
- Kuznetsova A, Brockhoff PB and Christensen RHB** (2017) lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software* **82**, 1–26.
- Kwon YJ and Saeed S** (2003) Effect of temperature on the foraging activity of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) on greenhouse hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Applied Entomology and Zoology* **38**, 275–280.
- Mallik PC** (1957) Morphology and biology of the mango flower. *Indian Journal of Horticulture* **4**, 1–23.
- Marcos-García MA** (1985) Los Syrphidae (Diptera) de las sierras occidentales del Sistema Central español. Subfamilias : Erystalinae, Lampetiinae, Microdontinae, Milesiinae y Cerianinae. *Boletín Asociación española Entomología* **IX**, 187–210.
- McGregor SE** (1976) *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants*. Washington: Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.
- Mohsen AMA** (2019) Survey of insect mango pollinators and the pollination occurrence of mango trees in relations to fruit yields. *Current Science International* **8**, 245–251.
- Morimoto T, Kojima Y, Toki T, Komeda Y, Yoshiyama M, Kimura K, Nirasawa K and Kadowaki T** (2011) The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees. *Ecology and Evolution* **1**, 201–217.
- Mukherjee SK** (1953) The mango – its botany, cultivation, uses and future improvement, especially as observed in India. *Economic Botany* **7**, 130–162.
- Mukherjee SK** (1997) Introduction: botany and importance. In Litz RE (ed.), *The Mango. Botany, Production and Uses*. Wallingford: CAB International, pp. 1–19.
- Munj A, Zote V, Raut R and Salvi B** (2017) Survey and surveillance of pollinators of mango in South Konkan coastal region of Maharashtra. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **5**, 190–192.
- Ne'eman G, Jürgens A, Newstrom-Lloyd L, Potts SG and Dafni A** (2010) A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **85**, 435–451.
- Pekas A, De Craecker I, Boonen S, Wäckers FL and Moerkens R** (2020) One stone; two birds: concurrent pest control and pollination services provided by aphidophagous hoverflies. *Biological Control* **149**, 104328.
- Pérez-Bañón MC** (2000) *Biología de los sírfidos (Diptera: Syrphidae) de los ecosistemas insulares de la Comunidad Valenciana: aspectos de la relación sírfido-planta* (Tesis Doctoral). Universidad de Alicante, Alicante.
- Popenoe W** (1917) *The Pollination of the Mango*. Washington, DC: Department of Agriculture.
- Rader R, Howlett BG, Cunningham SA, Westcott DA, Newstrom-Lloyd LE, Walker MK, Teulon DAJ and Edwards W** (2009) Alternative pollinator taxa are equally efficient but not as effective as the honeybee in a mass flowering crop. *Journal of Applied Ecology* **46**, 1080–1087.
- Rajan VV and Reddy PVR** (2019) A dead heat in pollination race: a comparative evaluation of the efficiency of a fly (*Chrysomya megacephala*) and a bee (*Apis florea*) in mango pollination. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **7**, 1087–1091.
- Reddy PVR and Sreedevi K** (2016) Arthropod communities associated with mango (*Mangifera Indica* L.): diversity and interactions. In *Economic and Ecological Significance of Arthropods in Diversified Ecosystems: Sustaining Regulatory Mechanisms*. Singapore: Springer Singapore, pp. 271–298.
- Rodríguez-Gasol N, Avilla J, Alegre S and Alins G** (2019) *Sphaerophoria rueppelli* adults change their foraging behavior after mating but maintain the same preferences to flower traits. *BioControl* **64**, 149–158.
- Rotheray GE and Gilbert FS** (2011) *The Natural History of Hoverflies*. Tresaith, Wales, UK: Forrest Text.
- Sabara HA and Winston ML** (2003) Managing honey bees (Hymenoptera: Apidae) for greenhouse tomato pollination. *Journal of Economic Entomology* **96**, 547–554.
- Saeed S, Naqqash MN, Jaleel W, Saeed Q and Ghouri F** (2016) The effect of blow flies (Diptera: Calliphoridae) on the size and weight of mangos (*Mangifera indica* L.). *PeerJ* **4**, e2076.
- Sharma R, Abbas SR, Shukia RP and Sharma S** (1998) An easy and quick method of breeding flies for pollination of mango blossoms. *Insect Environment* **4**, 76–77.

- Sihag RC and Abrol DP** (1986) Correlation and path-coefficient analysis of environmental factors influencing flight activity of *Apis florea* F. *Journal of Apicultural Research* **25**, 202–208.
- Simon-Delso N, Martin GS, Bruneau E, Minsart L-A, Mouret C and Hautier L** (2014) Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *PLoS ONE* **9**, e103073.
- Singh RN** (1954) Studies on floral biology and subsequent production of fruits in the mango (*Mangifera indica* L.) varieties Dushehari and Langra. *Indian Journal of Horticulture* **11**, 69–88.
- Singh LB** (1960) *The Mango: Botany, Cultivation and Utilization*. London: L. Hill.
- Soleyman-Nezhadiyan E and Laughlin R** (1998) Voracity of larvae, rate of development in eggs, larvae and pupae, and flight seasons of adults of the hoverflies *Melangyna viridiceps* Macquart and *Symosyrphus grandicornis* Macquart (Diptera: Syrphidae). *Australian Journal of Entomology* **37**, 243–248.
- Sousa JH, Pigozzo CM and Viana BF** (2010) Polinização de manga (*Mangifera indica* L. – Anacardiaceae) variedade Tommy Atkins, no vale do São Francisco, Bahia. *Oecologia Australis* **14**, 165–173.
- Souza DTM and Halak AL** (2009) Comportamento de forrageamento de abelhas e outros insetos nas panículas da mangueira (*Mangifera indica* L.) e produção de frutos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* **31**, 335–341.
- Speight MCD** (2011) *Species Accounts of European Syrphidae (Diptera)*, Vol. 65. Glasgow: Syrph the Net publications.
- Ssymank A** (1991) Die funktionale Bedeutung des Vegetationsmosaiks eines Waldgebietes der Schwarzwaldvorbergzone für blütenbesuchende Insekten: untersucht am Beispiel der Schwebfliegen (Diptera, Syrphidae). *Phytocoenologia* **19**, 307–390.
- Ssymank A** (2001) Vegetation und blütenbesuchende Insekten in der Kulturlandschaft: Pflanzengesellschaften, Blühphänologie, Biotopbindung und Raumnutzung von Schwebfliegen (Diptera, Syrphidae) im Drachenfels Ländchen sowie Methodenoptimierung und Landschaftsbewertung. *Tierwelt in der Zivilisationslandschaft, Teil V Schriftenreihe für Landschaftspflege und Naturschutz*.
- Sukhvilul N, Whiley AW, Smith MK, Hetherington SE and Vithanage V** (1999) Effect of temperature on inflorescence development and sex expression of mono- and poly-embryonic mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **74**, 64–68.
- Sung IH, Lin MY, Chang CH, Cheng AS and Chen WS** (2006) Pollinators and their behaviors on mango flowers in Southern Taiwan. *Formosan Entomologist* **26**, 161–170.
- Szabo TI** (1980) Effect of weather factors on honeybee flight activity and colony weight gain. *Journal of Apicultural Research* **19**, 164–171.
- Thyselius M, Gonzalez-Bellido PT, Wardill TJ and Nordström K** (2018) Visual approach computation in feeding hoverflies. *Journal of Experimental Biology* **221**, jeb177162.
- Usha and Srivastava P** (2018) Foraging reward and foraging behavior of insect visitors on mango flowers during blooming period. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* **8**, 99–102.
- Usha U, Srivastava P and Goswami V** (2014) Diversity of floral insect visitors of mango during blooming period at Pantnagar. *The Indian Journal of Agricultural Sciences* **84**, 363–364.
- Usman M, Bilquees F and Jaskani M** (2001) Breeding in mango. *International Journal of Agriculture and Biology* **8530**, 522–526.
- Vasanthakumar S, Aruna R and Srinivasan MR** (2018) Pollinator diversity in mango ecosystem in major mango growing areas of Tamil Nadu. *International Conference on Biocontrol and Sustainable Insect Pest Management (ICBS 2018)*, India, 83–85.
- Venables WN and Ripley BD** (2002) *Modern Applied Statistics with S*. New York: Springer.
- Vishwakarma R and Singh R** (2017) Foraging behaviour of insect visitors and their effect on yield of mango var. Amrapali. *Indian Journal of Entomology* **79**, 72–75.
- Wellington W and Fitzpatrick S** (1981) Territoriality in the drone fly, *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae). *The Canadian Entomologist* **113**, 695–704.
- Willmer PG** (1983) Thermal constraints on activity patterns in nectar-feeding insects. *Ecological Entomology* **8**, 455–469.
- Wratten SD, White AJ, Bowie MH, Berry NA and Weigmann U** (1995) Phenology and ecology of hoverflies (Diptera: Syrphidae) in New Zealand. *Environmental Entomology* **24**, 595–600.

CAPÍTULO IV: HOVERFLY POLLINATION ENHANCES YIELD AND FRUIT QUALITY IN MANGO UNDER PROTECTED CULTIVATION



Sánchez, M., Velásquez, Y., González, M., & Cuevas, J. (2022). Hoverfly pollination enhances yield and fruit quality in mango under protected cultivation. Resubmitted after major revision in *Scientia Horticulturae*.

Hoverfly pollination enhances yield and fruit quality in mango under protected cultivation

Sánchez, M.^{1,2*}, Velásquez, Y.², González, M.³, Cuevas, J.¹

¹ Department of Agronomy, University of Almería, ceiA3, La Cañada de San Urbano s/n, 04120, Almería, Spain

² Polyfly S.L., Avenida de la Innovación 15, 04131, Almería, Spain

³ Experimental Station of Foundation Cajamar, Paraje Las Palmerillas 25, 04710, El Ejido, Almería, Spain

*Corresponding author: msanchez@polyfly.es

Abstract

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the main tropical fruit crops worldwide. Although mostly grown in open fields, protected cultivation of mango has recently increased. Pollination in mango mainly occurs by flies (myophily) among which the group of cristaline hoverflies (Diptera: Syrphidae) stands out. Greenhouse studies were conducted on the pollination services provided by *Eristalinus aeneus* released at three densities in a protected mango orchard in southern Spain, during two consecutive seasons (2019 and 2020). Medium and high densities (30 and 45 individuals per square meter, respectively) led to higher number of floral visits to the middle and apical portions of the inflorescences where hermaphrodite flowers are more common, which resulted in more pollen grains being transferred to the stigma of fertile flowers. Medium and high densities of *E. aeneus* increased yields and improved fruit quality compared to low density (15 individuals per square meter), no insect release, and conventional pollination management using bumblebees. Yield enhancement achieved by using hoverflies as pollinating agents at medium and high densities imply an economic gain for farmers ranging from 16% to 29% in 2019 and 212% to 456% in 2020. Therefore, our results suggest that medium and high densities of *E. aeneus* are profitable pollination solutions for mango cultivated under greenhouses.

Keywords: mango crop, protected mango pollination, alternative pollinators, hoverfly pollination, *Eristalinus aeneus*, pollen-pistil interactions

Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) is a tropical fruit crop belonging to the family Anacardiaceae. Mango blooms forming very large apical panicles composed of from a

few hundred to several thousand flowers, with a variable proportion of hermaphrodite and male flowers (i.e. it is andromonoecious). The proportion of hermaphrodite and male flowers varies greatly depending on the season, cultivar, tree, branch, as well as on the environmental and management conditions and especially within panicles with most hermaphrodite flowers in the apex (Galán-Saúco, 2014; Geetha et al., 2016; Mukherjee, 1997; Shü, 1999; Singh, 1954; Sukhvibul et al., 1999). Most mango cultivars are considered self-compatible, while some others benefit from cross-pollination. Whatever the case may be, pollen transfer from the anthers to the stigma is always required for normal fruit development (Popenoe, 1917; Singh, 1954; Free and Williams, 1976). In outdoor mango, the flowers are visited by a large number of insects belonging to the group of Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera and Coleoptera. Particularly, for making this pollen transfer, mango flowers attract a great diversity of flies, which results in myophily being the main pollination syndrome for this crop (Ramírez and Davenport, 2016, 2012). In southeastern Spain, some wild insects are observed foraging on mango flowers inside greenhouses. These groups included calliphorid dipterans (*Calliphora* sp, *Chrysomya* sp. and *Lucilia* sp.), sarcophagids (*Sarcophaga* sp.), other syrphids (*Eristalinus aeneus*, *Eristalinus taeniops*, *Eristalis tenax*, *Episyrphus balteatus*, *Eupeodes* sp., *Sphaerophoria rueppellii*, *Syrphus* sp., *Volucella zonaria*) and tachinids (*Tachina* sp.). Some hymenopterans such as wasps (*Sceliphron* sp., *Vespa* sp.), bumblebees (*Bombus terrestris*, *Xylocopa* sp.), and bees (*Apis mellifera*, *Osmia* sp.) are also observed during flowering.

The high economic and nutritional value of its fruits makes mango the most cultivated species of the family Anacardiaceae. FAO reports that worldwide area for a group that also includes mangosteen and guava accounts for 5.5 million ha, with an increase of 12% in the last decade (FAO, 2021). In Europe, mango cultivation is concentrated in Spain (SE and Canary Islands) with 4,838 ha in open fields and 287 ha under protected cultivation in plastic greenhouses (FAOSTAT, 2021). The most widespread commercial variety in Spain is 'Osteen', accounting for nearly 80% of the cultivated area, due to its favourable harvest dates, high yield, easy handling, and satisfactory postharvest behaviour (Calatrava et al., 2013).

In recent years, greenhouse cultivation of mango has aroused great interest worldwide since enables early harvest and provides protection against pests, diseases and harsh environmental conditions thus improving yield and fruit quality (Akinaga and

Hasbullah, 2002; Galán-Saúco, 2015; Hermoso et al., 2018; Lionakis and Loxou, 1997; Medany et al., 2009; Mizuno et al., 2007; Yonemoto, 2018). However, greenhouse production can lead to situations of pollination deficits because wild pollinators cannot access to the crop. Making things worse, none of the commercially available hymenopteran pollinators, such as honeybees or bumblebees, are effective in mango since its flowers are not attractive to them and its floral rewards are insufficient to maintain the colonies of these social insects (Du Toit and Swart, 1993; Free and Williams, 1976; Popenoe, 1917; Sung et al., 2006; Usman et al., 2001). For the aforementioned reasons, alternative pollinators for mango in protected cultivation based on flies (Alqarni et al., 2017; Dag and Gazit, 2000; Galán-Saúco et al., 1997; Saeed et al., 2016; Sharma et al., 1998) and bees (Dag et al., 2001; Dag and Gazit, 2000; Mizuno et al., 2007) need to be tested.

In this regard, cristaline hoverflies (Diptera: Syrphidae) have drawn attention because of their abundance and frequent visits to mango flowers (Alqarni et al., 2017; Anderson et al., 1982; Dag and Gazit, 2000; Fajardo et al., 2008; Gajendra Singh, 1997; Kumar et al., 2016; Mohsen, 2019; Rajan and Reddy, 2019; Reddy and Sreedevi, 2016; Sung et al., 2006; Usha et al., 2014; Vishwakarma and Singh, 2017). Among the potential pollinators, *E. aeneus* seems to be a good candidate for pollinating mango under protected cultivation because of its foraging behaviour and its adaptability to greenhouse environments (Sánchez et al., 2022).

The aim of this study was to confirm the pollination effectiveness of *E. aeneus* in mango cultivated in a plastic greenhouse, comparing three release densities of said hoverfly. To reach this objective, we analyzed the foraging behaviour of this pollinator, the processes involving pollen-pistil interaction after pollen transport as well as fruit set, size and yield.

Materials and methods

Site and plant material

The experiments were carried out in an experimental plastic greenhouse of Grupo La Caña, located in Motril, Granada (Spain) (36°43'47.7 "N, 3°27'28.9 "W). The greenhouse was a galvanized steel multi-tunnel type of 1,122 m² covered with a 3-layer non-photosensitive polyethylene plastic with passive lateral ventilation. The mango plantation included 'Osteen', 'Irwin', 'Keitt', 'Ataulfo' and 'Langra' cultivars from which three-year-

old 'Osteen' trees 2 m tall, 2.0 x 2.5 m spaced and trained following an espalier were selected for the trial. 'Osteen' is a medium-late monoembryonic variety, although its cultivation in greenhouses accelerates its ripening. It should be noted that in our region, mango often presents an early bloom, before March, scarcely viable due to frequent seed abortion. This early flowering is usually removed by hand. Following inflorescence removal, a second and more abundant bloom is produced in more suitable dates (Galán-Saúco, 2014; Hermoso et al., 2018).

The experimental design was a randomized block design with four treatments and three replicates. Twelve cages were set-up with a white insect-proof net (6x6 threads/cm²) to compare different hoverfly release densities: high density (HD) with 45 individuals/m², medium density (MD) with 30 individuals/m², and low density (LD) with 15 individuals/m². A control without hoverflies was included in the experimental design. For the hoverfly treatments, three 14 m² (7.5x1.8x2.2 m) cages with three small trees each were used as replicates, while three 9 m² (5.0x1.8x2.2 m) cages with two enclosed trees were used for the control (C). The means of each cage were used as the replicated values.

Outside the cages, the greenhouse owners placed two commercial hives of bumblebees (*Bombus terrestris terrestris*) (~1 hive/500 m²). Since putting a bumblebee hive inside the cage was impossible, these bumblebee-pollinated trees (n=18) are not considered as a treatment. However, they were used as reference of conventional system.

A single release of *E. aeneus* pupae (Goldfly[®], Polyfly, Spain) was made in each treatment and replicate; 630 pupae were introduced per cage in HD, 420 pupae in MD, and 210 pupae in LD. To corroborate that the density in each treatment was accurate, the emergence of adult hoverflies was checked days after the introduction of the boxes containing the pupae. The final emergence results exceeded 96% in both years of the experiment, thus reaching the targeted density. The hoverflies were released when the first flowers of the earliest panicles started to bloom: stage 514 and 515 according to the BBCH scale (Hernández Delgado et al., 2011). In 2019, the release occurred on March 26, and on March 10 in 2020. Water and sugar supply were placed in each enclosure in plastic containers and Petri dishes, respectively to ensure the hoverflies would not miss vital resources.

In 2019, data collection focused on pollen-pistil interaction, crop production and fruit quality, while in 2020, observations were extended including the number of floral

visits and pollen transport. During this second year, the course of pollen-pistil interaction at different phenological stages of flowering was compared. The temperature was recorded throughout the flowering period of both years using three dataloggers (Inkbird IBS-TH1 Plus) placed inside the cages. In 2019, the average temperature was 19.1°C, with a maximum of 36.4°C and a minimum of 8.9°C. In 2020, lower temperatures were recorded, with an average of 17.3°C, a maximum of 34.8°C, and a minimum of 7.6°C.

Floral visits

In 2020, the number of floral visits was recorded one week after the introduction of the pupae. During four non-consecutive days over a two-week period, 5-minute observations on three different panicles, one of each tree, per replicate of each treatment were made to evaluate the number of insect visits and their duration.

Pollen transport

In 2020, five hoverflies per replicate and treatment were captured at each stage of the flowering period (early, full and late flowering) and preserved in 1 ml vials containing 70° ethanol. These specimens were later analyzed under microscopy to determine the pollen load on their bodies, following the procedure indicated by Dafni et al. (2005).

Pollen-pistil interaction

Pollen-pistil interaction was assessed in both years. In 2019, 25 flowers per replicate and treatment (i.e. 75 flowers per treatment) were harvested after flowering ended. In 2020, 25 flowers per replicate and treatment were also collected but, this time in three distinct periods: early, full and late flowering (900 flowers total). Flowers were randomly collected from different panicles, when the color of the petals indicated the beginning of senescence (Pérez, 2013). The flowers were preserved in FAE (formalin, glacial acetic acid, and 70 % ethanol in a 1:2:17 v/v ratio) until they were analyzed under fluorescence microscopy (Martin, 1959). After fixation, FAE was removed by successive washes with water and afterwards the flowers were immersed in a softening solution (NaOH 0.8 N) for 4 hours, followed by a final wash with water for 8 hours. The flowers were dissected and stained with aniline blue to observe pollen adhesion on the stigma, pollen growth on the style, and the arrival of the pollen tube at the ovule (Figure 1). Pollen adhesion and germination, pollen tube growth in the transmitting tissue of the style, and ovule fertilization were compared among treatments. Pollen adhesion was assessed by

counting the number of pollen grains per flower adhered to the stigma and by establishing the percentage of flowers with pollen grains present on the stigma. A pollen grain was considered germinated when its pollen tube was at least as long as its diameter. Pollen germination was expressed as the ratio of adhered and germinated pollen grains. Pollen tube growth was quantified by the number of pollen tubes reaching the base of the style. Finally, fertilization was estimated by the percentage of flowers showing the penetration of the pollen tube through the side of the ovule mango flowers contain (fertilization by chalazogamy).

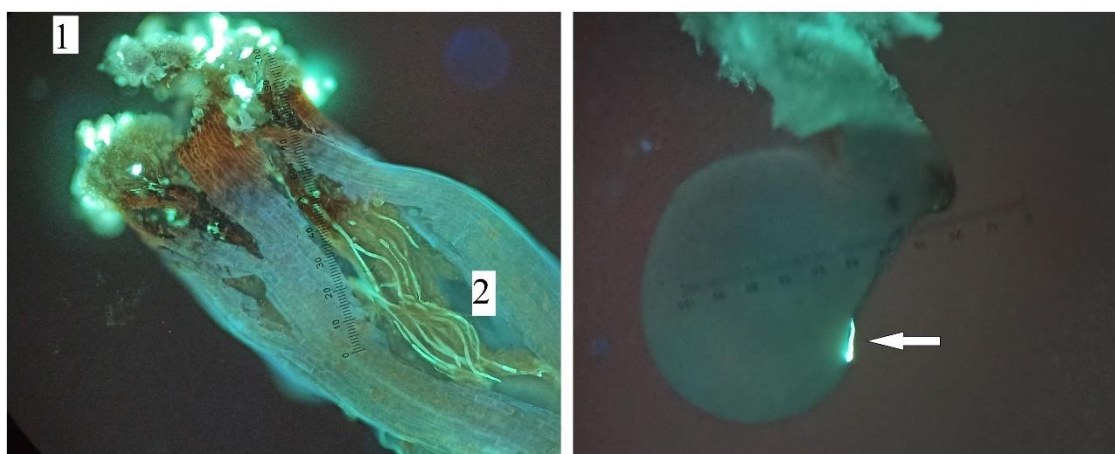


Figure 1. Adhesion and germination of pollen grains (1); and pollen tube growth (2) (left). Fertilization of mango ovule (right). Arrow shows the pollen tube penetrating the ovule. The ovule was dissected to allow better observation.

Fruit set, yield and components

In 2019 and 2020, pollination effectiveness was determined according to the three *E. aeneus* release densities. This was done by quantifying the initial and final fruit set on 10 panicles per tree, corresponding to fruits in stages A (3 weeks after flowering; fruits at 10% of their final size) and B (10 weeks after flowering; fruits at 30% of final size) (Aubert and Lossois, 1972).

Crop production was estimated at harvest by counting the number of panicles with fruit, the number of fruits per panicle, as well as the number and weight of fruit per replicate and treatment. Finally, the fruits were classified into commercial categories according to their weight, as follows: fruits <300 g; 300-500 g, 500-700 g, 700-1000 g, and >1,000 g. Fruits weighing <300 g were deemed non-commercial. Considering the production and the average price of the fruit, the yield (t/ha) and the resulting economic value (€/ha) were calculated for each treatment. The data compiled by the Observatory of Prices and Markets showed that the average price received by the farmer was 1.54 €/kg

in August 2019, and 1.74 €/kg in August 2020 (Junta de Andalucía, 2021). The economic analysis does not include the costs of releasing this pollinating insect because its industrial mass-rearing is still under development and definitive economic figures will depend on ongoing field studies in several protected crops.

Data analyses

Statistical analysis was performed with R Statistical software (R-Core Team, version 4.0.2, Vienna, Austria). For the analysis of insect activity, represented by the number and duration of visits, Generalized Linear Models (GLM) were fitted. For the model of the number of visits recorded with counts, a GLM with Poisson distribution and log-link for the response variable was used. In the case of the duration of the insect visits, a square root transformation was performed on the dependent variable (time of visits in seconds) to ensure a normal distribution of the response variable. In both cases, for the number and duration of visits, the models contained the independent variables of release densities and of the area of the panicles where the visits took place. A GLM was also used for the determination of insect pollen transport, with the number of pollen grains on the insect body as the dependent variable, and the release density and flowering stage as independent factors. The final models were selected by comparing the AICc (Akaike Information Criterion) value against the value of the full models. To ensure no violation of the normality and homoscedasticity assumption of the residuals, all models were graphically inspected with quantile-quantile plots (Q-Q plots) and histogram graphics. Subsequent separation of means was performed by Tukey's test ($p < 0.05$).

Data on pollen adhesion and germination, pollen tube growth, and percentage of fertilized flowers were analyzed by analysis of variance (ANOVA). In 2020, adhesion and fertilization data were square-root transformed before analysis so as not to violate the assumption of homoscedasticity. The data on the proportion of flowers with adhesion and pollen germination and of fertilized flowers were subjected to angular transformation before analysis. Finally, the separation of means was carried out by Tukey's test ($p < 0.05$).

The initial and final fruit sets, expressed as the number of fruits per panicle, were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and compared in both years for the different treatments. Fruit production in both years was analyzed by analysis of covariance (ANCOVA), with the number of fruits per tree as the dependent variable, the number of

panicles per tree as the covariate, and the density of release as the independent factor. Finally, fruit weight was compared among the different treatments and a commercial categorization of fruit by weight was performed. When significant differences were detected, means were separated using Tukey's test ($p < 0.05$).

Results

Floral visits

In 2020, 741 visits by *E. aeneus* were recorded in the 72 panicles kept under observation (Figure 2). The results show that the number of visits depended on the release density ($p < 0.0001$) and the section of the panicle visited ($p < 0.0015$). Floral visits were significantly more frequent as the release density increased, with the highest number of visits being observed in HD (12 visits/panicle/5 minutes) and the minimum number of visits in LD (2 visits /panicle/5 minutes). There was a significant effect on the panicle part visited, with the highest number of visits recorded in the apical and middle sections. This pattern was observed across all treatments (Table 1).



Figure 2. Visit of *Eristalinus aeneus* nectar-feeding on mango hermaphrodite flower.

Table 1. Hoverfly visits (mean \pm SE) in the different sections of the panicle at each release density. HD: high density (45 individuals/m²); MD: medium density (30 individuals/m²); LD: Low density (15 individuals/m²).

	Apical	Middle	Basal	Mean
HD	3.47 \pm 0.30	3.39 \pm 0.25	2.69 \pm 0.26	9.56 \pm 0.18 a
MD	2.61 \pm 0.18	2.83 \pm 0.22	1.94 \pm 0.25	7.39 \pm 0.23 b
LD	1.22 \pm 0.16	1.33 \pm 0.16	1.08 \pm 0.17	3.64 \pm 0.14 c
Mean	2.44 \pm 0.16 A	2.52 \pm 0.15 A	1.91 \pm 0.15 B	

* In the last column, different lower-case letters indicate significant differences between release densities. In the last row, different capital letters indicate significant differences between panicle portions (Tukey's test $p < 0.05$).

The duration of the visits was mainly determined by the panicle section visited ($p = 0.0025$). In contrast, there was no significant effect of the release density ($p = 0.1893$). The minimum duration of the floral visits was 3 seconds, while the maximum exceeded the observation time of 300 seconds. This maximum was reached in all treatments and panicle sections, with the only exception of the basal region in the LD treatment, where the longest duration was 261 seconds (Table 2).

Table 2. Duration (mean \pm SE) of floral visits for different hoverflies release densities and different panicle visitation portions.

	Apical	Middle	Basal	Mean
HD	93.16 \pm 6.82	103.92 \pm 6.06	122.08 \pm 6.85	105.1 \pm 3.85 a
MD	98.86 \pm 8.43	103.93 \pm 7.69	105.42 \pm 9.23	102.54 \pm 4.83 a
LD	115.64 \pm 13.53	103.10 \pm 12.70	92.08 \pm 11.37	104.03 \pm 7.32 a
Mean	98.96 \pm 4.97 A	103.78 \pm 4.53 A	110.66 \pm 5.04 A	

* In the last column, different lower-case letters indicate significant differences between release densities. In the last row, different capital letters indicate significant differences between panicle portions (Tukey's test $p < 0.05$).

Pollen transport

In 2020, 135 hoverflies were collected and the pollen load on their bodies estimated. The number of mango pollen grains carried on the hoverflies body did not depend on the density at which they were released ($p = 0.1542$), but was strongly dependent on the phenological stage of flowering of the plants ($p < 0.0001$). Pollen load was significantly higher during full and late flowering for all treatments (Table 3). Mango pollen grains were observed on all specimens, but the presence of other types of pollen (mostly *Oxalis* sp. and *Taraxacum* sp.) was also detected in some cases. *Oxalis* and

Taraxacum grains came from the floral visits performed by the hoverflies on weeds that appeared spontaneously under mango trees.

Table 3. Mango pollen load (mean \pm SE) on the insect body for the different release treatments throughout the flowering period.

	Early	Full	Late	Mean
HD	369.33 \pm 31.08	823.00 \pm 48.86	1,070.33 \pm 67.74	754.22 \pm 52.24 a
MD	282.33 \pm 44.10	1,085.33 \pm 99.74	937.33 \pm 53.93	768.33 \pm 65.85 a
LD	224.67 \pm 61.66	982.00 \pm 62.37	1,108.00 \pm 89.21	771.56 \pm 71.54 a
Mean	292.11 \pm 28.15 B	963.44 \pm 44.56 A	1,038.56 \pm 41.62 A	

* In the last column, different lower-case letters indicate significant differences between release densities. In the last row, different capital letters indicate significant differences between panicle portions (Tukey's test $p < 0.05$).

Pollen-pistil interaction - 2019 trial

In 2019, significant differences in pollen adhesion were found depending on pollinator density. In HD and MD, the proportion of flowers with adhered pollen grains was 96% and 95%, respectively, but it was lower in LD treatment with just 76%. In control plants, without hoverflies present, the percentage of pollinated flowers was drastically reduced to 17%. Significant differences were also detected in the number of pollen grains attached to the stigma of the flowers according to the treatments ($F_{(3,8)} = 11.87$, $p = 0.003$). Treatments HD and MD showed the highest number of pollen grains adhered (approximately 9 grains/flower), followed by LD with an average of 4 pollen grains per flower, and the control which did not reach the minimum value of 1 pollen grain per stigma, given the high percentage of virgin, unvisited flowers (Table 4).

On the other hand, the percentage of pollen germination did not show significant differences between treatments ($F_{(3,8)} = 0.81$, $p = 0.5236$), with values comprised between 71% and 87%. The number of pollen tubes reaching the base of the style and entering the ovary was higher in HD and lowest in C ($F_{(3,8)} = 9.60$, $p = 0.005$). Moreover, the proportion of pollinated pistils that had pollen tubes at the end of the style, at its junction with the ovary, was highest in HD and MD (85%), followed by LD (78%) and C (69%). Fertilization was significantly higher too in treatments HD and MD ($F_{(3,11)} = 28.89$; $p =$

0.0001), with percentages of 56% and 53%, respectively. Conversely, treatment LD and C showed much lower values, with 23 and 8% of flowers, respectively (Table 4).

Table 4. Pollen adhesion, pollen germination, pollen tube growth, and flower fertilization (Mean \pm SE) for the different pollination treatments in 2019.

	Pollen adhesion (grains/flower)	Pollen germination (%)	Pollen tube growth (tubes/flower)	Fertilization (%)
HD	8.85 \pm 0.32 ab	74.39 \pm 11.16 a	2.02 \pm 0.24 a	56.00 \pm 6.11 a
MD	9.55 \pm 1.53 a	70.91 \pm 6.97 a	1.93 \pm 0.26 ab	53.33 \pm 2.67 a
LD	3.81 \pm 1.97 bc	83.61 \pm 6.36 a	1.38 \pm 0.29 ab	22.67 \pm 2.67 b
Control	0.39 \pm 0.21 c	86.87 \pm 6.72 a	0.82 \pm 0.24 b	8.00 \pm 4.00 c

* In the same column, different letters indicate significant differences between treatments (Tukey's test $p < 0.05$).

Pollen-pistil interaction - 2020 trial

In 2020, both the release density and flowering stage had significant effects on the percentage of pollinated flowers ($p < 0.0001$). HD and MD showed again higher percentages of pollinated flowers, with 77% and 63%, respectively. Considering phenological stages, important for programming hoverfly release, early flowering showed the lowest percentage of flowers with pollen grains attached to the stigma (38%), followed by full and late flowering (47% and 54%, respectively). Similarly, HD had more pollen grains per flower adhered to the stigma at all flowering stages, with an average of 5 pollen grains per flower, just twice as many as MD and 5 times more than LD (Tables 5 and 6).

Regarding pollen germination, the results did not show any significant differences between treatments, although there were significant differences among the flowering periods ($F_{(2,31)} = 5.52$; $p = 0.008$). Indeed, pollen germination appeared to increase as flowering progressed towards the full and later periods, and temperatures rose. No significant differences in the number of pollen tubes entering the ovary were observed, either for the different flowering stages or among treatments (Tables 5 and 6).

Considering ovule fertilization, both the flowering period and the density of release had significant effects on ovule fertilization ($p = 0.0016$ and $p = 0.0018$, respectively). The release of hoverflies increased the percentage of fertilized flowers, reaching significant differences with respect to the control. The percentage of fertilized

flowers was also found to be significantly higher as the flowering progressed (Tables 5 and 6).

Table 5. Pollen adhesion, pollen germination, pollen tube growth, and flower fertilization (Mean \pm SE) for the different pollination treatments in 2020.

	Pollen adhesion (grains/flower)	Pollen germination (%)	Pollen tube growth (tubes/flower)	Fertilization (%)
HD	5.22 \pm 0.82 a	85.97 \pm 2.58 a	1.04 \pm 0.10 a	28.44 \pm 5.79 a
MD	2.57 \pm 0.59 b	88.18 \pm 2.19 a	0.87 \pm 0.09 a	19.11 \pm 4.75 ab
LD	0.87 \pm 0.20 c	86.55 \pm 1.27 a	0.85 \pm 0.05 a	10.22 \pm 2.32 ab
Control	0.16 \pm 0.03 c	86.00 \pm 5.50 a	0.92 \pm 0.05 a	4.00 \pm 1.15 b

* In the same column, different letters indicate significant differences between treatments (Tukey's test $p < 0.05$).

Table 6. Pollen adhesion, pollen germination, pollen tube growth, and flower fertilization (Mean \pm SE) for the different flowering periods in 2020.

	Pollen adhesion (grains/flower)	Pollen germination (%)	Pollen tube growth (tubes/flower)	Fertilization (%)
Early	1.38 \pm 0.59 b	78.27 \pm 2.67 b	0.79 \pm 0.07 a	8.67 \pm 4.77 b
Full	2.19 \pm 0.78 ab	87.01 \pm 2.70 ab	1.02 \pm 0.04 a	17.33 \pm 3.46 a
Late	3.05 \pm 0.73 a	90.47 \pm 1.76 a	0.93 \pm 0.07 a	20.33 \pm 4.01 a

* In the same column, different letters indicate significant differences between treatments (Tukey's test $p < 0.05$).

In general, positive effects on pollen-pistil features were observed after the introduction of hoverflies both in 2019 and 2020 (Tables 4 and 5). These positive effects were, at least to some extent, driven by the higher pollinator activity in the HD and MD treatments. Thus, higher pollen adhesion had a positive effect on fertilization levels in both years, which means that the flowers that received more pollen had a higher probability of being successfully fertilized ($\chi^2 = 79.624$, $df = 2$, $p < 0.0001$). The range of 1-5 pollen grains attached showed the lowest percentage of flower fertilization (25%), followed by the range of 6-10 pollen grains (51%) and, finally, by flowers with more than 10 pollen grains which exhibited a 71% probability of fertilization.

Fruit set, harvest and components

During blooming, the average number of flowered panicles per tree was 22.21 \pm 12.54 in 2019, and 26.45 \pm 10.69 in 2020. The introduction of *E. aeneus* increased yield and fruit quality and significant differences were observed depending on the release

density of this pollinator. In both years, 2019 and 2020, the percentage of panicles that developed commercial fruits, the number of fruits per plant and fruit weight, as well as initial and final fruit set, were higher in HD and MD than in LD and C treatments (Table 7). The percentage of fruitful inflorescences at harvest was positively influenced by the introduction of hoverflies in both years (Figure 3). On the contrary, hoverfly density had no effect on the number of fruits per panicle which was strongly determined by heavy fruitlet competition within the panicle. However, a certain positive effect of density release persisted, with HD = 1.43 ± 0.11 vs C = 1.06 ± 0.06 fruits/panicle in 2019, and HD = 1.50 ± 0.04 vs C = 1.42 ± 0.12 fruits/panicle in 2020.

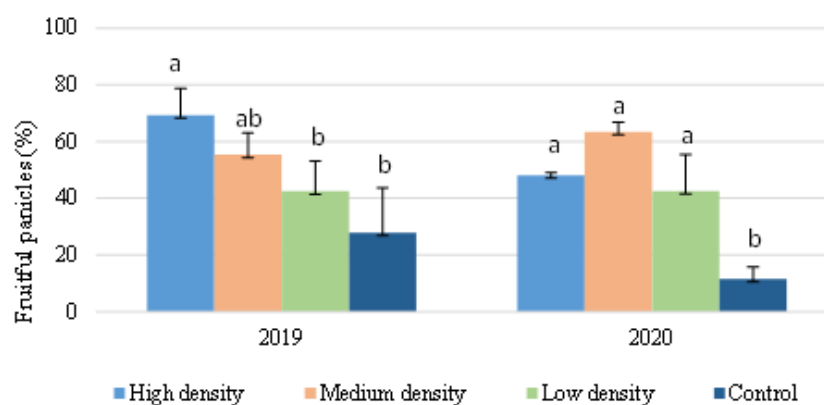


Figure 3. Panicles with commercial fruit (%) at 2019 and 2020 harvest. In the same year, different letters indicate significant differences among treatments (Tukey's test $p < 0.05$).

Table 7. Initial fruit set (IFS), final fruit set (FFS) (fruits/panicle), fruit production per plant, and fruit weight (g) (Mean \pm SE) during 2019 and 2020 in the different release density treatments.

	2019				2020			
	IFS	FFS	Fruits per plant	Fruit weight (g)	IFS	FFS	Fruits per plant	Fruit Weight (g)
HD	19.57 \pm 1.77a	1.67 \pm 0.09a	14.56 \pm 1.49a	605.48 \pm 58.17a	11.91 \pm 0.64a	2.36 \pm 0.42a	18.67 \pm 2.69a	683.33 \pm 32.55a
MD	23.73 \pm 2.71a	1.67 \pm 0.12a	14.67 \pm 6.18a	573.33 \pm 26.21a	9.31 \pm 0.56b	2.23 \pm 0.19a	17.89 \pm 2.21ab	633.33 \pm 47.25ab
LD	10.78 \pm 0.86b	0.99 \pm 0.05b	12.33 \pm 1.53ab	633.33 \pm 21.20a	5.85 \pm 0.41c	0.76 \pm 0.13b	12.99 \pm 0.97ab	540.74 \pm 43.55bc
C	5.06 \pm 0.91 b	0.06 \pm 0.04c	4.33 \pm 1.89b	301.22 \pm 78.27b	3.58 \pm 0.28d	0.1 \pm 0.05b	6.33 \pm 1.92b	411.11 \pm 45.73c

* In the same column, different letters indicate significant differences between treatments (Tukey's test $p < 0.05$).

Regarding commercial classification of the fruit, a higher percentage of fruits in the 500-700 grams range was harvested in trees pollinated by hoverflies both seasons, although no differences were found among release densities. In control trees, almost half

of the fruits (46%) weighed less than 300 g and were, therefore, considered non-commercial (Figure 4).

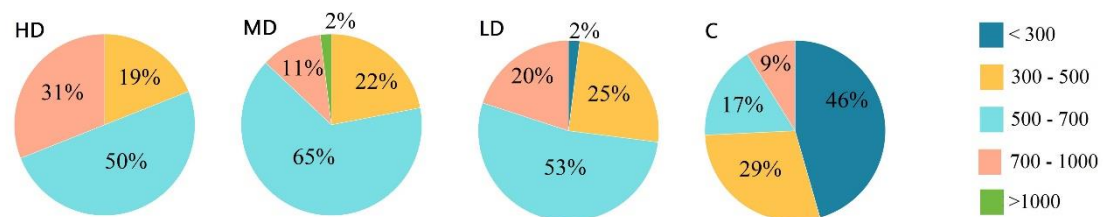


Figure 4. Classification of fruits by commercial categories based on fruit weight (g) in 2019 and 2020 for the different treatments.

Yield was increased by the introduction of *E. aeneus* in terms of crop yield (t/ha) and value (€/ha). In both years, higher yields and profits were obtained in HD treatment, and to a lesser extent in MD and LD. The lowest yields and profits were obtained in C treatment without insects (Table 8).

Table 8. Crop yield (t/ha) and economic return (€/ha) under three hoverfly densities and control without insect release.

	2019		2020	
	t/ha	€/ha	t/ha	€/ha
HD	17.33	26,693.59	25.29	43,998.02
MD	16.56	25,495.31	22.38	38,946.19
LD	15.57	23,978.38	14.20	24,704.17
Control	2.78	4,271.46	4.98	8,661.30

The production obtained in the rest of the greenhouse out of *E. aeneus* cages and with conventional pollination was lower than that obtained by pollination with syrphids. In 2019, the production of the trees outside the enclosures was 13.67 ± 2.02 fruits/tree, with an average fruit weight of 489.33 ± 13.01 g, thereby supposing a yield of 13.48 t/ha. In 2020 ('off year'), the production of those trees dropped to 5.89 ± 1.52 fruits/tree, with an average fruit weight of 386.21 ± 30.48 g leading to a yield of 4.55 t/ha.

Discussion

The global decline of pollinators, their delicate management and recurrent crop pollination deficits make it necessary to look for alternative pollination solutions for protected crops, including mango (Amano, 2004; Dag, 2008; Descamps et al., 2021;

Evans et al., 2019; Garibaldi et al., 2018; Heinrich, 1979; Kendall et al., 2021; Kwon and Saeed, 2003; Mditshwa et al., 2019; Occhiuzzi, 1999; Osterman et al., 2021; Reilly et al., 2020). This study provides, for the first time, detailed information confirming that *E. aeneus* is an effective pollinator of protected mango under protected cultivation. Furthermore, our results show that the release density of this pollinator positively affects yield and quality (size) of mango fruits.

The efficacy of *E. aeneus* lies in its abundance, foraging behaviour and ability to transport pollen grains on its body. We found that the rate of inflorescence visits made by *E. aeneus* under the three densities tested was higher than those of other pollinators observed in open fields by Munj et al. (2017), such as *Chrysomya* sp., *Apis cerana indica* and *Tetragonula* sp. (5.9, 6.4 and 11.5 visits/h, respectively). Moreover, the highest number of floral visits at these three densities were recorded in the apical and middle sections of the inflorescences, where a greater proportion of hermaphrodite flowers is present (Chaikiattiyos et al., 1997; Golec, 2019; Sánchez et al., 2021; Sukhvibul et al., 1999). It is well-known that pollinator behaviour can affect pollination efficiency (Ne'eman et al., 2010) and, in this case, we found that a higher number of floral visits increased the amount of pollen grains deposited on the stigma of recipient flowers and the number of fertilized flowers, thus, resulting in a higher pollination efficacy. Our results showed a relationship between the number of pollen grains deposited and the success in flower fertilization, achieving higher fruit set (over 70%) in flowers with more than 10 pollen grains adhered. A greater number of deposited pollen grains in the stigma can lead to a better pollen germination and fertilization, as the competition between pollen tubes influences their growth speed through the style (Dutta et al., 2013; Hormaza and Herrero, 1992). This may affect seed quality, fruit set and, fruit size and characteristics (Delph and Havens, 1998; Mulcahy and Mulcahy, 1987). Our data suggest that optimum yield and economic return may be achieved via the implementation of high and medium densities of *E. aeneus* (Table 8). These benefits come from higher fertilization levels, which are likely due to a better distribution of more readily available pollen grains among the flowers of the mango panicle. Strikingly, the higher number of fruits per tree under HD, and to a lesser extent in MD, was compatible with heavier fruits (Table 7), possibly owing to larger seed size and quality as reported by Lucas-García (2021). This phenomenon is often observed in uniseed drupes such as peach, olive, jujube and mango, where seed and fruit size are often related (Aráoz et al., 2004; Blumenfeld and Gazit,

1974; Cuevas and Oller, 2002; Lucas-García et al., 2021; Rodríguez-Pleguezuelo et al., 2012; Souza et al., 2016).

Regarding pollen transport, several previous studies have highlighted the capacity of dipterans to transfer mango pollen, with hoverflies typically being the group that shows greater pollen loads on their body (Huda et al., 2015; Jiron and Hedstrom, 1985; Usha and Srivastava, 2018). This was confirmed in our trial as *E. aeneus* showed a significant pollen transport capacity. Since no differences in pollen load and similar average duration of floral visits were found in all three treatments, the higher pollination efficiency observed in HD and MD treatments is explained by the greater number of floral visits occurring when more hoverflies are released. In addition, a higher number of individuals visiting the flowers did not affect pollen germination (Tables 4 and 5).

Mango yield may range from 5 to 30 t/ha, depending on several factors such as year (given mango alternate bearing), variety, management, environmental conditions, tree age and planting density and size (Bally, 2006). In greenhouses, the production of well-developed monovarietal adult plantations is similar to that obtained in open-air fields, about 20 t/ha, but can be increased in multivarietal plantations up to 37.5 t/ha (Galán-Saúco, 2002, 2014, 2015). These protected crops are generally pollinated by bees and bumblebees with the help of wild pollinators. The yield obtained with a single release of hoverflies was similar and even higher than that obtained in open-air or protected adult 'Osteen' plantations, but lower than expected likely due to young age of the trees and the monovarietal condition of this trial plantation (Table 8). Fruit weight and commercial classification were also found to be within the established ranges for this crop when grown outdoors (Galán-Saúco, 2014; Junta de Andalucía, 2020). The number of fruits per panicle and the number of panicles with fruit affect crop yield. The main differences observed here are the percentages of panicles that developed commercial fruits, as they reached values of 69.32% in HD in 2019, and 63.37% in MD in 2020 (Figure 3). Indeed, these percentages are higher than those reported for 'Osteen' in open field (47%) (Pérez, 2013). This confirms the excellent efficacy of *E. aeneus* when released at a density greater than or equal to 30 individuals/m². A higher number of fruits in the mango panicle would favour competition among them, but the development of only one or two fruits in the inflorescence increases the total number of fruits, the weight and the yield per tree at harvest (Yeshitela et al., 2004). Nevertheless, our results showed no differences in the number of fruits per inflorescence according to the density of release, as it was between

1.25 and 1.50 fruits per panicle, consistent with the number of fruits per panicle usually obtained in this crop (Bally, 2006; Pérez, 2013).

Our data suggest that optimum yield and economic return may be achieved via the implementation of high and medium densities of *E. aeneus* (Table 8). The comparison with yields obtained in similar 'Osteen' trees grown inside the greenhouse but out of the cages shows that the yield achieved with hoverflies exceeded those reached through conventional pollination management with commercial bumblebees and wild insect visitors. Moreover, in both years, the production per tree and derived yield obtained when hoverflies were released (Table 7) was found to be higher than in C treatment (without insects). This increase in yield equates to an economic gain ranging between 16 and 29 % in 2019, and 212 and 456 % in 2020, depending on the insect density applied in the greenhouse.

In conclusion, this trial shows the pollination ability of *E. aeneus* for mango crops grown under greenhouses in southeastern Spain. Nonetheless, hoverfly pollination in larger protected areas with other or a combination of mango varieties should be studied, since cross-pollination between different mango varieties typically improves yields (Dag et al., 1998; Dutta et al., 2013; El-Habashy et al., 2016; Galán-Saúco et al., 1997; Lucas-García et al., 2021; Pérez et al., 2016). If this is the case, the release of hoverflies at low densities should be further investigated, because of the possible positive effects on pollen diversity and pollinator mobility between different trees. Moreover, it is known that functional complementarity in plant-pollinator interactions favors more effective pollinations. Therefore, a combination of different species of pollinators should be assessed in greenhouse production (Blüthgen and Klein, 2011). *E. aeneus* was used in this trial because it is a common visitor of mango flowers and it is abundant in the Mediterranean basin, but other species belonging to the cristaline syrphid group could also be tested in other locations around the world. Additionally, due to the high importance of open-air mango cultivation, the potential use of hoverflies as alternative or complementary pollinators in these production systems should also be investigated.

Acknowledgments

We are very grateful to Grupo La Caña for allowing us to carry out this study in their greenhouses. This study is part of a Ph.D. project supported by the Ministry of Innovation

and Science of Spain that co-financed the contract to M. Sánchez (DI-17-09575: Predoctoral grant for research training in companies “Industrial Doctorates”).

References

- Akinaga, T., Hasbullah, R., 2002. Mango production using plastic greenhouse in Okinawa. *Acta Hort.* 575, 745–749. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.575.87>
- Alqarni, A., Ahmed, K., Hannan, M., Ghose, G., Munshi, J., 2017. Flies for the pollination of greenhouse mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) in the Subtropical Iriomote Island, Japan. *J. Asiat. Soc. Bangladesh, Sci.* 43, 135–141. <https://doi.org/10.3329/jasbs.v43i1.46252>
- Amano, K., 2004. Attempts to introduce stingless bees for the pollination of crops under greenhouse conditions in Japan. *Food and Fertilizer Technology Center*. <http://www.ffc.agnet.org/library/article/tb167.html> (accessed 1.31.2022).
- Anderson, D., Sedgley, M., Short, J., Allwood, A., 1982. Insect pollination of mango in northern Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 33, 541-548. <https://doi.org/10.1071/AR9820541>
- Aráoz, S., Longo, O.D., Karlin, O., 2004. Germinación de semillas de *Ziziphus mistol* Grisebach III. Correlaciones paramétricas del tamaño y peso de drupas, endocarpos y semillas con la germinación y el vigor. *Multequina* 13, 51–56.
- Aubert, B., Lossois, P., 1972. Considerations sur la phenologie des especes fruitieres arbustive. 2" partie. *Fruits* 27, 269–286.
- Bally, I.S.E., 2006. *Mangifera indica* (mango), in: Elevitech, C.R. (Ed.), Traditional trees of Pacific Islands: Their Culture, Environment and Use. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawaii, pp. 441–464.
- Blumenfeld, A., Gazit, S., 1974. Development of seeded and seedless avocado fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99, 442–448.
- Blüthgen, N., Klein, A., 2011. Functional complementarity and specialisation: The role of biodiversity in plant–pollinator interactions. *Basic and Applied Ecology* 12, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.11.001>
- Calatrava, J., Sayadi, S., Sarmiento, D., Guirado, E., 2013. Return analysis of ‘Osteen’ and ‘Kent’ mango orchards in SouthEastern Mainland Spain. *Acta Hort.* 992, 87–93. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.992.9>
- Chaikiattiyos, S., Pongsomboon, W., Dasanonda, M., Anupunt, P., 1997. Floral sex expression of ‘Khieo Sawoei’ and ‘Nam Dok Mai’ mangoes grown in tropical and subtropical climates in Thailand. *Acta Hort.* 455, 202–208. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.455.27>
- Cuevas, J., Oller, R., 2002. Olive seed set and its impact on seed and fruit weight. *Acta Hort.* 586, 485–488. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.100>
- Dafni, A., Kevan, P., Husband, B., 2005. Practical Pollination Biology. Enviroquest, Ontario, Canada.
- Dag, A., 2008. Bee pollination of crop plants under environmental conditions unique to enclosures. *J. Apic. Res.* 47, 162–165. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101444>
- Dag, A., Eisenstein, D., Gazit, S., El-Batsri, R., Degani, C., 1998. Effect of pollenizer distance and selective fruitlet abscission on outcrossing rate and yield in ‘Tommy Atkins’ mango. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123, 618–622. <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.4.618>

- Dag, A., Gazit, S., 2000. Mango pollinators in Israel. *J. Appl. Hortic.* 2, 39–43. <https://doi.org/10.37855/jah.2000.v02i01.12>
- Delph, L., Havens, K., 1998. Pollen competition in flowering plants, in: Birkhead, T.R., Møller, A.P. (Eds.), *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, San Diego, pp. 149–173. <https://doi.org/10.1016/B978-012100543-6/50030-1>
- Descamps, C., Jambrek, A., Quinet, M., Jacquemart, A.-L., 2021. Warm temperatures reduce flower attractiveness and Bumblebee foraging. *Insects* 12, 493. <https://doi.org/10.3390/insects12060493>
- Du Toit, A.P., Swart, D.J., 1993. Pollination of mango in the Letsitele Valley during the 1992 flowering season: first report. Yearbook, S. Afr. *Mango Growers' Assoc* 13, 129–130.
- Dutta, S.K., Srivastav, M., Rymbai, H., Chaudhary, R., Singh, A.K., Dubey, A.K., Lal, K., 2013. Pollen–pistil interaction studies in mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Sci. Hortic.* 160, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.012>
- El-Habashy, S., Maklad, M.F., Ahmed, E.A.H., 2016. Effect of self and cross-pollination in some local mango cultivars on fruit set and retained fruits. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* 16, 1776–1783. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2016.1776.1783>
- Evans, L.J., Cutting, B.T., Jochym, M., Janke, M.A., Felman, C., Cross, S., Jacob, M., Goodwin, M., 2019. Netted crop covers reduce honeybee foraging activity and colony strength in a mass flowering crop. *Ecol. Evol* 9, 5708–5719. <https://doi.org/10.1002/ece3.5154>
- Fajardo, A., Medina, J., Opina, O., Cervancia, C., 2008. Insect pollinators and floral visitors of mango (*Mangifera indica* L. cv. Carabao). *Philipp. Agric. Sci.* 91, 372–382.
- FAO, 2021. *Major tropical fruits: Market review 2020*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAOSTAT, 2021. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. URL <http://www.fao.org/faostat/es/#data> (accessed 8.20.21).
- Free, J.B., Williams, I.H., 1976. Insect pollination of *Anacardium occidentale* L., *Mangifera indica* L., *Blighia sapida* Koenig and *Persea americana* Mill. *Trop. Agric.* 53, 125–139.
- Gajendra Singh, Dr., 1997. Pollination, pollinators and fruit setting in mango. *Acta Hortic.* 455, 116–123. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.455.16>
- Galán-Saúco, V., 2002. Greenhouse cultivation of tropical fruits. *Acta Hortic.* 575, 727–735. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.575.85>
- Galán-Saúco, V., 2014. *Mango, litchi y pitaya*, in: Hueso, J.J., Cuevas, J. (Eds.), *La fruticultura del siglo XXI en España*, Serie Agricultura. Cajamar Caja Rural, España, pp. 360–367.
- Galán-Saúco, V., 2015. Ventajas y desventajas del cultivo del mango (*Mangifera indica* L.) en zonas subtropicales y potencial del cultivo bajo invernadero. *Acta Hortic.* 1075, 167–177. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1075.19>
- Galán-Saúco, V., Galván, D., Hernández Conde, J.C., Navarro, A., 1997. Preliminary studies on fruit-set of mango cultivar Tommy Atkins under greenhouse cultivation in the Canary Islands. *Acta Hortic.* 455, 530–537. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.455.69>
- Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Aizen, M.A., Packer, L., Harder, L.D., 2018. *Sustainable yields, sustainable growth or neither?*, in: *The Potential for Insect Pollinators to Alleviate Global Pollination Deficits and Enhance Yield of Fruit and Seed Crops*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italia, pp. 35–53.

- Geetha, G.A., Shivashankara, K.S., Reddy, Y.T.N., 2016. Varietal variations in temperature response for hermaphrodite flower production and fruit set in mango (*Mangifera indica* L.). *S. Afr. J. Bot.* 106, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.07.011>
- Golec, A.F.C., 2019. El Estudio floral de mango (*Mangifera indica* var. Tommy Atkins), limón sutil (*Citrus aurantifolia*) y lúcumo (*Pouteria lucuma*) en el departamento de Lima en Perú. *Anales Científicos* 80, 253–258.
- Heinrich, B., 1979. “Majoring” and “Minoring” by foraging Bumblebees, *Bombus Vagans*: An experimental analysis. *Ecology* 60, 245–255. <https://doi.org/10.2307/1937652>
- Hermoso, J.M., Guirado Sánchez, E., Farré Massip, J.M., 2018. *Introducción al cultivo de mango en el Sur Peninsular*. Caja Rural Granada, Granada.
- Hernández Delgado, P.M., Aranguren, M., Reig, C., Fernández Galván, D., Mesejo, C., Martínez Fuentes, A., Galán-Saúco, V., Agustí, M., 2011. Phenological growth stages of mango (*Mangifera indica* L.) according to the BBCH scale. *Sci. Hortic.* 130, 536–540. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.027>
- Hormaza, J.I., Herrero, M., 1992. Pollen selection. *Theor. Appl. Genet.* 83, 663–672. <https://doi.org/10.1007/BF00226682>
- Huda, A.N., Salmah, M.R.C., Hassan, A.A., Hamdan, A., Razak, M.N.A., 2015. Pollination services of mango flower pollinators. *J Insect Sci* 15, 113. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev090>
- Jiron, L.F., Hedstrom, I., 1985. Pollination ecology of mango (*Mangifera indica* L) (Anacardiaceae) in the neotropic region. *Turrialba* 35, 269–277.
- Junta de Andalucía, 2021. Observatorio de precios y mercados. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. URL <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?ec=default> (accessed 9.16.21).
- Junta de Andalucía, 2020. Datos básicos de mango. Campaña 2020. Observatorio de precios y mercados. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. URL <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&table=11114&element=3659697&subsector=&> (accessed 10.31.21).
- Kendall, L.K., Evans, L.J., Gee, M., Smith, T.J., Gagic, V., Lobaton, J.D., Hall, M.A., Jones, J., Kirkland, L., Saunders, M.E., Sonter, C., Cutting, B.T., Parks, S., Hogendoorn, K., Spurr, C., Gracie, A., Simpson, M., Rader, R., 2021. The effect of protective covers on pollinator health and pollination service delivery. *Agric. Ecosyst. Environ.* 319, 107556. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107556>
- Kumar, S., Joshi, P.C., Nath, P., Singh, V.K., Mansotra, D.K., 2016. Role of insects in pollination of mango trees. *Int. Res. J. Biological Sci.* 5, 64–67.
- Kwon, Y.J., Saeed, S., 2003. Effect of temperature on the foraging activity of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) on greenhouse hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Appl. Entomol. Zool.* 38, 275–280. <https://doi.org/10.1303/aez.2003.275>
- Lionakis, S.M., Loxou, B.K., 1997. Behaviour of some mango cultivars in the greenhouse, under net an outdoors in the area of Chania Crete. *Acta Hortic.* 455, 401–406. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.455.51>
- Lucas-García, R., Rosas-Guerrero, V., Alemán-Figueroa, L., Almazán-Núñez, R.C., Violante-González, J., Kuk-Dzul, J.G., 2021. Spatial proximity of ‘Ataulfo’ to ‘Haden’ cultivar increases mango yield and decreases incidence of nubbins. *Agronomy* 11, 450. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030450>

- Martin, F.W., 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34, 125–128. <https://doi.org/10.3109/10520295909114663>
- Mditshwa, A., Magwaza, L.S., Tesfay, S.Z., 2019. Shade netting on subtropical fruit: Effect on environmental conditions, tree physiology and fruit quality. *Sci. Hortic.* 256, 108556. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108556>
- Medany, M., Abdrabbo, M., Farag, A., Hassanein, M., Abou Hadid, A., 2009. Growth and productivity of mango grown under greenhouse conditions. *Egypt. J. Hort.* 36, 373–382.
- Mizuno S., Yoshida T., Kiyokawa K., Sasaki M., 2007. Pattern of visiting flowers and pollination efficiency of three kinds of bees on “Irwin” mango fruits grown in plastic greenhouses. *Japanese Journal of Tropical Agriculture* 51, 116–122. <https://doi.org/10.11248/jsta1957.51.116>
- Mohsen, A.M.A., 2019. Survey of insect mango pollinators and the pollination occurrence of mango trees in relations to fruit yields. *Curr. Sci. Int.* 8, 245–251.
- Mukherjee, S.K., 1997. *Introduction: botany and importance*, in: Litz, R.E. (Ed.), *The Mango. Botany, Production and Uses*. CAB International, Wallingford, pp. 1–19.
- Mulcahy, D.L., Mulcahy, G.B., 1987. The effects of pollen competition. *American Scientist* 75, 44–50. <http://www.jstor.org/stable/27854449>
- Munj, A., Zote, V., Raut, R., Salvi, B., 2017. Survey and surveillance of pollinators of mango in South Konkan coastal region of Maharashtra. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5, 190–192.
- Ne’eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S.G., Dafni, A., 2010. A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biol Rev Camb Philos Soc* 85, 435–451. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00108.x>
- Occhiuzzi, P., 1999. Stingless bees thrive in glasshouse trial. *Aussie Bee* 12, 8–11.
- Osterman, J., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Bosch, J., Howlett, B.G., Inouye, D.W., Jung, C., Martins, D.J., Medel, R., Pauw, A., Seymour, C.L., Paxton, R.J., 2021. Global trends in the number and diversity of managed pollinator species. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 322, 107653. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107653>
- Pérez, V., 2013. *Biología reproductiva del mango (Mangifera indica L.)* (Tesis Doctoral). Universidad de Málaga, Málaga.
- Pérez, V., Herrero, M., Hormaza, J.I., 2016. Self-fertility and preferential cross-fertilization in mango (*Mangifera indica*). *Sci. Hortic.* 213, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.034>
- Popenoe, W., 1917. *The pollination of the mango*, Bulletin of the U.S. Department of Agriculture. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Rajan, V.V., Reddy, P.R., 2019. A dead heat in pollination race: A comparative evaluation of the efficiency of a fly (*Chrysomya megacephala*) and a bee (*Apis florea*) in mango pollination. *J. Entomol. Zool. Stud.* 7, 1087–1091.
- Ramírez, F., Davenport, T.L., 2016. Mango (*Mangifera indica* L.) pollination: A review. *Sci. Hortic.* 203, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.011>
- Ramírez, F., Davenport, T.L., 2012. *Reproductive Biology (Physiology)- The Case of Mango*, in: *Mango*. Studium Press, Houston, Texas, pp. 56–81.
- Reddy, P.V.R., Sreedevi, K., 2016. *Arthropod Communities Associated with Mango (Mangifera indica L.): Diversity and Interactions*. In: *Economic and Ecological Significance of Arthropods*

in Diversified Ecosystems: Sustaining Regulatory Mechanisms. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1524-3>

Reilly, J.R., Artz, D.R., Biddinger, D., Bobiwash, K., Boyle, N.K., Brittain, C., Brokaw, J., Campbell, J.W., Daniels, J., Elle, E., Ellis, J.D., Fleischer, S.J., Gibbs, J., Gillespie, R.L., Gundersen, K.B., Gut, L., Hoffman, G., Joshi, N., Lundin, O., Mason, K., McGrady, C.M., Peterson, S.S., Pitts-Singer, T.L., Rao, S., Rothwell, N., Rowe, L., Ward, K.L., Williams, N.M., Wilson, J.K., Isaacs, R., Winfree, R., 2020. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. *Proc. Royal Soc. B.* 287, 20200922. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0922>

Rodríguez-Pleguezuelo, Duran Zuazo, V.H., Muriel Fernández, J.L., Franco Tarifa, D., 2012. Physico-chemical quality parameters of mango (*Mangifera indica* L.) fruits grown in a Mediterranean subtropical climate (SE Spain). *J. Agric. Sci. Technol.* 14, 365–374.

Sánchez, M., Velásquez, Y., González, M., Cuevas, J., 2022. Activity and foraging behaviour of the hoverfly *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) in protected cultivation of mango (*Mangifera indica* L.). *Bull. Entomol. Res.* 112(1), 101–109. <https://doi.org/10.1017/S0007485321000717>

Shü, Z.H., 1999. Effect of temperature on the flowering biology and fertilization of mangoes (*Mangifera indica* L.). *J. Appl. Hortic.* 01, 79–83. <https://doi.org/10.37855/jah.1999.v01i02.03>

Singh, R.N., 1954. Studies on floral biology and subsequent production of fruits in the mango (*Mangifera indica* L.) varieties Dushehari and Langra. *Indian J. Hort* 11, 69–88.

Souza, A. das G., Smiderle, O.J., Spinelli, V.M., Souza, R.O. de, Bianchi, V.J., 2016. Correlation of biometrical characteristics of fruit and seed with twinning and vigor of *Prunus persica* rootstocks. *J. Seed Sci.* 38, 322–328. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v38n4164650>

Sukhvibul, N., Whiley, A.W., Smith, M.K., Hetherington, S.E., Vithanage, V., 1999. Effect of temperature on inflorescence development and sex expression of mono- and poly-embryonic mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 74, 64–68. <https://doi.org/10.1080/14620316.1999.11511073>

Sung, I.-H., Lin, M.-Y., Chang, C.-H., Cheng, A.-S., Chen, W.-S., 2006. Pollinators and their behaviors on mango flowers in Southern Taiwan. *Formosan Entomol.* 26, 161–170.

Usha, U., Srivastava, P., 2018. Foraging reward and foraging behavior of insect visitors on mango flowers during blooming period. *Int. J. Pure Appl. Biosci.* 6, 437–440.

Usha, U., Srivastava, P., Goswami, V., 2014. Diversity of floral insect visitors of mango during blooming period at Pantnagar. *Indian J. Agric. Sci.* 84, 363–364.

Usman, M., Bilquees, F., Jaskani, M., 2001. Breeding in mango. *Int. J. Agric. Biol.* 8530 (3–4), 522–526.

Vishwakarma, R., Singh, R., 2017. Foraging behaviour of insect visitors and their effect on yield of mango var. Amrapali. *Ind. Jour. of Entomol.* 79, 72. <https://doi.org/10.5958/0974-8172.2017.00016.5>

Yeshitela, T., Robbertse, P.J., Fivas, J., 2004. Effects of fruit thinning on “Sensation” mango (*Mangifera indica*) trees with respect to fruit quantity, quality and tree phenology. *Exp. Agric.* 40, 433–444. <https://doi.org/10.1017/S0014479704002091>

Yonemoto, J.Y., 2018. *Mango cultivation in greenhouses*, in: Galán-Saúco, V., Lu, P. (Eds.), *Achieving Sustainable Cultivation of Mangoes*, Burleigh Dodds Series in Agricultural. Burleigh Dodds Science Publishing, London, UK, pp. 185–205.

**CAPÍTULO V: BIOLOGÍA, MORFOLOGÍA Y
RECOMPENSAS FLORALES DEL CULTIVO
PROTEGIDO DE SANDÍA DIPLOIDE Y
TRIPLOIDE**



1. Introducción

La sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) es una especie generalmente monoica, con flores masculinas o estaminadas, y femeninas o pistiladas en un mismo pie (Adlerz, 1966; Delaplane y Mayer, 2000; Bomfim et al., 2015). Esta condición impone una polinización mediante geitonogamia (transferencia de polen de flores masculinas a femeninas de una misma planta) posible en el caso de los cultivares diploides, y/o xenogamia (polinización cruzada entre plantas de diferente genotipo) obligada en el caso de los cultivares triploides. Esta última obligación se explica porque los cultivares triploides producen, en su mayoría, granos de polen no viables (Maynard y Elmstrom, 1992; Bomfim et al., 2015; Subasinghe Arachchige et al., 2022).

Las flores de la sandía aparecen de manera solitaria en las axilas de las hojas y son de tamaño pequeño (aproximadamente 3 cm de diámetro), con cálices verdes formados por cinco sépalos fusionados en la base y corolas amarillas formadas por cinco pétalos también fusionados en la base (Schaffer y Paris, 2016). Las flores estaminadas se forman sobre todo en los nudos inferiores y se producen en mayor número que las pistiladas. Las flores pistiladas presentan un ovario ínfero redondeado u ovalado (Schaffer & Paris, 2016). El número de flores pistiladas y estaminadas en el cultivo de sandía no es equivalente (siempre mayor para las estaminadas), con oscilaciones que dependen del genotipo y de otros factores como la edad de la planta y las condiciones ambientales (Wein, 1997; Stanghellini et al., 2002; Njoroge et al., 2004; Emuh y Ojeifo, 2012).

Las características florales de la sandía la definen como una planta entomófila, de modo que, sin la acción de un vector de polinización biótico, las plantas de sandía no producen frutos (Walters, 2005; Guerra-Sanz, 2008; Bomfim et al., 2015). Esta dependencia hace que para su cultivo en invernadero sea necesaria la introducción de polinizadores bióticos manejados, siendo mayoritario el uso de abejas melíferas. Estos insectos no responden siempre bien a las condiciones impuestas por las cubiertas plásticas del invernadero, de modo que, el extendido cultivo protegido de sandía exige la búsqueda de polinizadores alternativos. El éxito de esos polinizadores alternativos dependerá en gran medida de la atracción que el polinizador sienta hacia las flores de este cultivo. La presencia de recompensas florales tiene la capacidad de modificar el comportamiento de los polinizadores, que se ven afectados también por otros factores como por ejemplo en la hora de apertura y cierre de las flores (Taha y Bayoumi, 2009).

La biología floral del cultivo de sandía ha sido descrita en cultivo al aire libre por diversos autores (Mann, 1943; Adlerz, 1966; Delaplane y Mayer, 2000; Stanghellini et al., 2002; Njoroge et al., 2004; Freeman et al., 2007; Bomfim et al., 2015). No obstante, no ha sido analizada en detalle bajo cultivo protegido, donde ocurren modificaciones de las condiciones ambientales, que pueden afectar a su atractivo para los insectos polinizadores.

El objetivo principal de este capítulo es estudiar la floración del cultivo protegido de sandía, mediante el análisis de su biología floral, incluyendo sus atractivos y recompensas florales, para determinar su potencial atractivo para los insectos polinizadores.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal y ubicación del ensayo

El ensayo se llevó a cabo en la finca experimental UAL-Anecoop, nave U19, ubicada en el término municipal de Retamar, Almería (España) (36° 51'55'' N, 2° 17'01'' W) (Figura 1), durante la primavera de 2021.



Figura 1. Ubicación de la Finca Experimental UAL-ANECOOP. El punto azul de la derecha indica la ubicación exacta del invernadero de sandía.

El invernadero cuenta con una superficie total de 1.024 m², con estructura tipo parral y cubierta de polietileno tricapa, con ventilación pasiva lateral y occidental con malla anti-insectos. El invernadero estaba compuesto por 8 capillas orientadas E-O, con dimensiones de 32 m de anchura y 32 m de largo, y una altura en canaleta de 3 m y de 4 m de altura en cumbre. La plantación de sandía se desarrolló en una zona del invernadero, con una superficie aproximada de 500 m². Para ello, se plantaron sandías

diploides (variedad Premium) y triploides (variedad Fashion) en una proporción 1:3 y a una densidad de plantación de 0.25 plantas/m².

La temperatura durante la floración se registró mediante la colocación de un datalogger (ORIA WA64). La temperatura media diaria en el interior del invernadero a lo largo de la floración osciló entre los 17,5 y los 24,8 °C. La media de las temperaturas mínimas osciló entre los 10,0 y los 17,4 °C, mientras que la media de las máximas osciló entre 21,3 y los 39,2 °C (Figura 2). Por otro lado, la humedad relativa (HR) media diaria osciló entre 50,6 y 89,3%, con mínimas entre 21,4 y 79,0%, y máximas entre 76,0 y 99,9% (Figura 3).

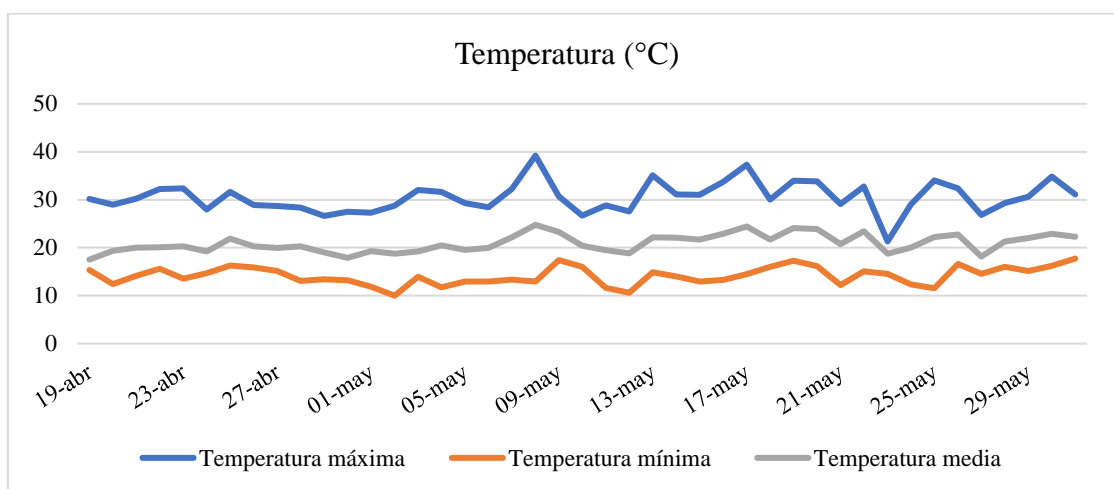


Figura 2. Registro de temperaturas medias, mínimas y máximas durante el ensayo.

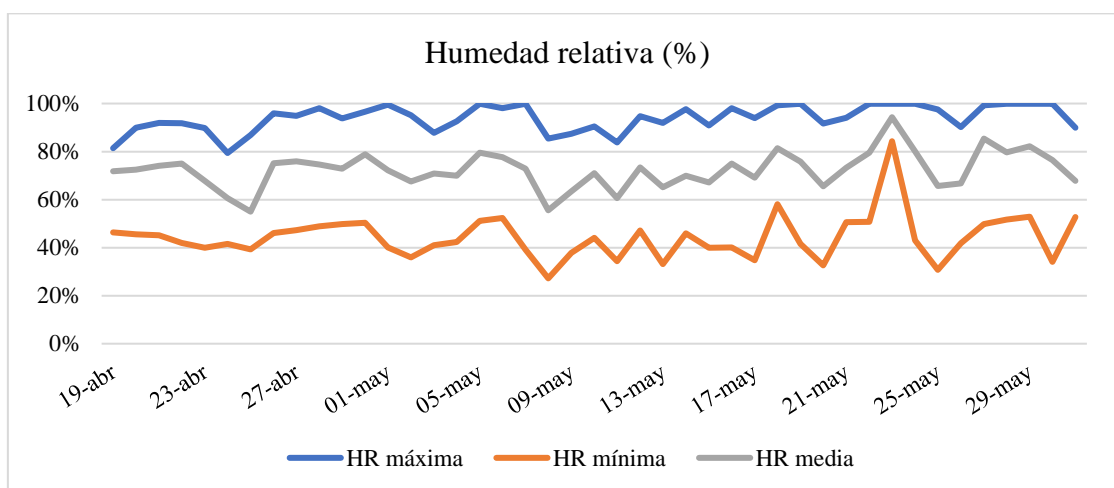


Figura 3. Registro de la humedad relativa (HR) media, mínima y máxima durante el ensayo

2.2. Parámetros evaluados

Biología floral

Al inicio de la plantación, se seleccionaron y aislaron tres plantas diploides y tres triploides para su seguimiento. Las observaciones se iniciaron con la aparición de las primeras flores femeninas. Desde ese momento, se retiraron las flores diariamente, anotando en cada variedad el tipo de flor que aparecía (pistilada o estaminada). La caracterización morfológica de ambos tipos de flores para los dos cultivares se realizó diariamente mediante la observación de las partes de la flor y sus medidas, en cinco flores de cada variedad y sexo, durante siete días no consecutivos. Las flores fueron seleccionadas el día de su apertura y las medidas se realizaron una vez sucedida la antesis total, entre las 11 y 12 de la mañana, empleándose para ello un calibre digital (PowerFix Z22855). Además, se determinaron los atractivos florales mediante patrones de coloración y la detección de guías nectarías bajo luz ultravioleta. El equipo empleado fue una caja oscura para fotografía, con una fuente de iluminación con bombillas < 300 nm y cámara réflex digital Canon EOS 77D con objetivo fijo 50 mm F 2.8 Canon.

Cuantificación de las recompensas florales

Para cuantificar la producción de néctar, se seleccionaron 5 flores de cada sexo y cultivar, para un total de 20 flores al día, durante cinco días no consecutivos (100 flores a lo largo del ensayo). Las flores fueron marcadas la mañana de su antesis y aisladas con bolsas de organza para evitar el contacto con los polinizadores. El néctar de cada flor fue recogido y medido con una micropipeta de precisión (Nahita serie 6600), tres veces al día, de 9:00 - 10:00, de 12:00 - 13:00 y de 15:00 - 16:00.

Para cuantificar el polen disponible se recolectaron las anteras de tres flores por variedad tras la apertura floral, durante cuatro días no consecutivos. Las flores fueron conservadas en Eppendorf de manera individual y almacenadas en congelador (-40°C) hasta su procesamiento en laboratorio. Para el análisis, a las anteras se le añadió 1 ml de agua destilada y se agitaron a máxima potencia, tomándose 10 submuestras de 15 µl que fueron observadas bajo microscopía x10 (Leica DM500). Posteriormente, se contaron los granos de polen de cada submuestra.

Caracterización nutricional de las recompensas florales

El análisis de la composición nutricional de las recompensas florales se realizó para el polen y para el néctar. Para el primero se hizo distinción entre las dos variedades de sandía diploide y triploide, recolectándose 25 anteras de cada variedad, en cuatro días no consecutivos, con un total de 100 anteras por variedad. También se realizó el análisis para el néctar, en tres períodos del día, distinguiéndose también entre cultivares. El procedimiento empleado fue el mismo que sirvió para establecer el volumen de néctar producido por las flores en el anterior apartado. Las muestras fueron conservadas a -40° C hasta su análisis. La caracterización de los componentes metabólicos del polen y del néctar fue realizada por el Departamento de Química y Física de la Universidad de Almería empleando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), siguiendo los protocolos establecidos para la preparación y análisis de muestras, y posterior análisis estadístico comparativo (Abreu et al., 2022; Tristán et al., 2022). Para la preparación de las muestras de néctar, este fue recogido directamente de los nectarios de la flor y liofilizado durante 48 horas. En el caso del polen, se utilizaron para ello 60 mg de polen por triplicado para cada muestra.

Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias en la proporción de flores pistiladas y estaminadas a lo largo del cultivo, en función de la variedad, se compararon mediante tablas de contingencia. Para determinar si el número de flores detectadas dependían del cultivar y del tipo de flor se realizó una prueba T-Student de dos muestras independientes. El diámetro de la flor se comparó mediante un modelo lineal (LM), con la variable dependiente del diámetro y como variables independientes el tipo de flor (pistilada o estaminada) y la variedad (diploide o triploide). Para el volumen de néctar, se determinó el efecto de la hora del día, variedad y tipo de flor con un modelo lineal generalizado (GLM). La variable respuesta incluida en el modelo fue el volumen de néctar previamente transformado a $\log_{10}(x+1)$ para alcanzar lo máximo posible una distribución normal de la variable. Para comparar el número de granos de polen por flor entre ambos cultivares se realizó una prueba T-Student. Estos análisis se realizaron con el Software R, versión 4.3.1.

3. Resultados y Discusión

Biología floral

Las variedades diploides y triploides estudiadas corresponden ambas con lo esperado en un cultivo monoico que produce flores imperfectas, correspondiente a flores pistiladas y estaminadas. La mayoría de los cultivares de sandía presentan este sistema reproductivo, aunque excepcionalmente se han documentado genotipos andromonoicos con flores hermafroditas y estaminadas (Goff, 1937; Adlerz, 1966; Delaplane y Mayer, 2000; Bomfim et al., 2015). Respecto a la cantidad de flores en antesis, ambos cultivares mostraron una alta proporción de flores estaminadas frente a las pistiladas durante toda la floración. La ratio de flores pistiladas y estaminadas fue similar en las dos variedades, 1:7 en la variedad diploide y 1:6 en la variedad triploide. En relación a esta ratio, algunas publicaciones muestran que esta proporción en otras variedades diploides oscilan entre 1:7 y 1:17 (Stanghellini et al., 2002; Njoroge et al., 2004; Taha y Bayoumi, 2009; Emuh y Ojeifo, 2012). Stanghellini et al. (2002) establecen para un cultivar triploide una ratio de 1:18, muy diferente al observado en este ensayo. Esto puede deberse a las condiciones ambientales, edad de la planta o incluso al propio cultivar (Wein, 1997).

La proporción de flores pistiladas y estaminadas no fue diferente según cultivar ($\chi^2 = 3,43$; $df = 1$; $p = 0,0639$), siendo en ambos siempre superior la producción de flores estaminadas. En el cultivar diploide se registró un 12% de flores pistiladas, frente a un 88% de flores estaminadas; mientras que, en el triploide, los porcentajes fueron de un 15 y 85%, respectivamente. En todas las fechas, se observó que el número de flores por planta variaba según el tipo de flor ($t = -14,43$; $df = 70,53$; $p < 0,0001$) y de la variedad ($t = -2,36$; $df = 117,22$; $p = 0,0199$).

Respecto a la apertura de las flores, las dos variedades presentaron una apertura iniciada a las 8:00. En torno a las 9:00 se observó la apertura total de los pétalos, que pasaron a presentar un plano horizontal. A esta hora, las condiciones ambientales registradas eran de 0,78 klux de radiación, 18,5 °C de temperatura y 84,1% de HR. Posteriormente, entre las 15:00 y 16:00, las flores comenzaban a retraer sus pétalos hasta cerrarse. Este proceso duró hasta las 18:00 – 19:00, cuando las flores cerraban completamente sus pétalos. Durante el cierre, las condiciones ambientales eran 26,2°C de temperatura, 49,8% de HR y 23,2 klux de radiación. La antesis duró, en ambos cultivares, aproximadamente 9 horas, tal y como observó Bomfim et al. (2015). No obstante, es

conocido que las condiciones ambientales pueden modificar la duración de la antesis en sandía (Stanghellini et al., 2002; Bomfim et al., 2015).

En ambos cultivares, las primeras flores en aparecer, aproximadamente a los 38 días después del trasplante, fueron estaminadas. El pico de floración se observó, para ambos tipos de flores y variedades, aproximadamente 60 días después del trasplante (Figura 4), coincidiendo con el periodo durante el que la mayoría de las variedades presentan un pico en su floración, sobre todo de flores estaminadas, aproximadamente a los dos meses de la plantación (Emuh y Ojeifo, 2012).

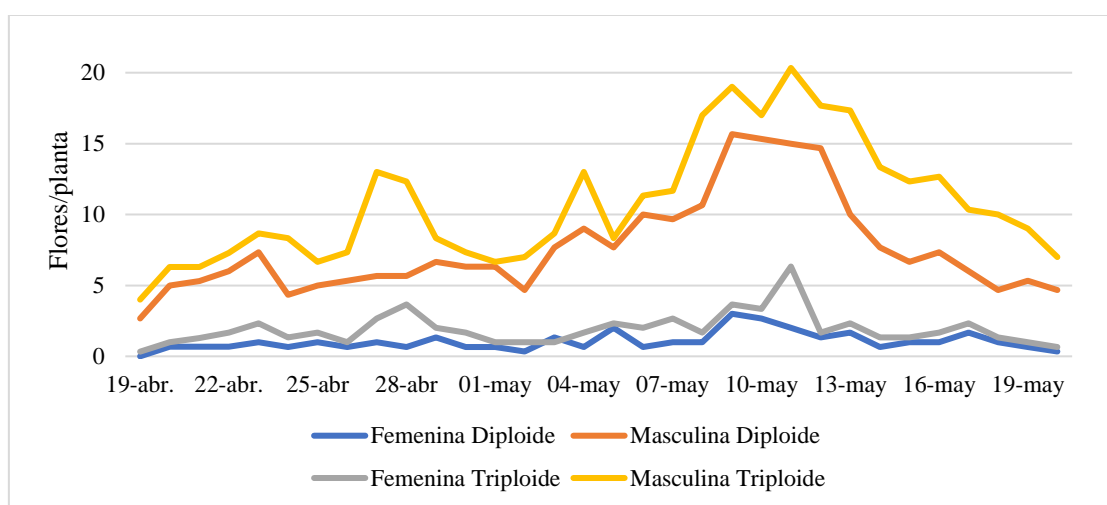


Figura 4. Evolución de la floración (promedio de flores por planta) de sandía diploide y triploide con separación de flores estaminadas y pistiladas

Morfología floral

Un total de 140 flores fueron utilizadas para su descripción morfológica, 70 por cultivar. Tanto las flores estaminadas como las pistiladas presentaban un cáliz con 5 diasépalos de color verde y una corola actinomorfa compuesta por 5 pétalos amarillos unidos en la base. No se encontraron diferencias en la morfología respecto al número de pétalos, anteras, carpelos o el color de la corola, ya anteriormente descritos por diferentes autores (Castro López et al., 2013; Bomfim et al., 2015).

Las flores estaminadas presentaron un pedúnculo más largo. Algunos autores explican esto como una adaptación para atraer a los polinizadores, ya que sobresalen más del forraje de la planta aumentando su visibilidad (Wijesinghe et al., 2020). Todas las

flores estaminadas presentaron tres estambres separados entre sí e insertados en el centro de la flor. Las anteras presentaban dehiscencia longitudinal y estaban ubicadas sobre un filamento. El polen, pegajoso y de color amarillo, aparecía en gran cantidad, mayor en la variedad diploide. A poca profundidad, en la base interna de la corola, aparecía el nectario floral.

El prominente ovario ínfero de las flores pistiladas hacía fácilmente distinguible estas flores ya antes de la apertura floral. El ovario estaba unido a un estilo grueso y corto, coronado por tres, excepcionalmente cuatro, lóbulos estigmáticos. Esta presencia de flores con cuatro lóbulos estigmáticos ha sido señalada por otros autores (Bomfim et al., 2015). El ovario de las flores pistiladas de la variedad triploide es de mayor tamaño según diferentes autores (Freeman et al., 2007; Bomfim et al., 2015). En esta flor, el nectario se encontraba en la base del estilo a poca profundidad (Figura 5). Durante la apertura floral, tanto en el cultivar diploide como en el triploide, se observó abundante exudado estigmático, como ha sido indicado en otros cultivares (Bomfim et al., 2015).

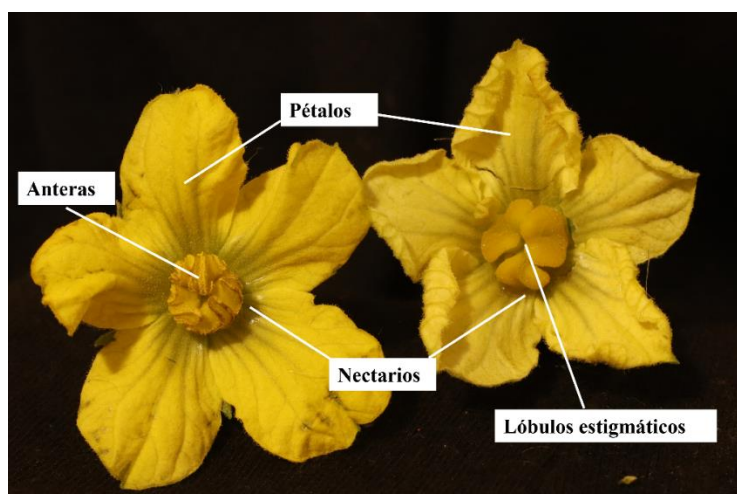


Figura 5. Flor estaminada (izquierda) y pistilada (derecha) de sandía, indicando cada una de sus partes.

Respecto al diámetro de las flores, se encontraron diferencias significativas, en función de la variedad y tipo de flor (Cuadro 1). En el cultivar diploide, las flores estaminadas presentaron un diámetro ligeramente superior de la corola que las pistiladas ($3,44 \pm 0,31$ y $3,21 \pm 0,31$ cm, respectivamente). En el cultivar triploide, las flores de mayor diámetro fueron las flores pistiladas ($3,87 \pm 0,53$ versus $3,53 \pm 0,54$ cm).

Cuadro 1. Resultado del Modelo Lineal (Análisis de devianza tipo III) para el diámetro de las flores (variable respuesta), en función del tipo de flor y variedad de sandía (variables independientes).

	S. C.	G.L.	F	Pr (>F)
Intercept	361,68	1	1907,43	< 0,0001 ***
Tipo de flor	0,85	1	4,49	0,0359 *
Variedad	7,54	1	39,77	< 0,0001 ***
Tipo*Variedad	2,76	1	14,55	0,0002 ***
Residuals	25,79	136		

Por último, los atractivos florales desarrollados por las plantas reflejan o absorben los rayos UV. En otras ocasiones se presenta en forma de patrones en partes periféricas y centrales de la flor que absorben los rayos UV (Silberglie, 1979). En sandía, bajo luz ultravioleta, se observaron sobre las flores estaminadas zonas de las anteras donde se reflejaba intensamente la luz. No se hallaron guías nectarías ni zonas más brillantes en los pétalos en ninguna de las flores bajo luz ultravioleta (Figura 6).



Figura 6. Flor estaminada (arriba) y pistilada (abajo) de sandía bajo iluminación ultravioleta (izquierda) y luz visible (derecha).

Cuantificación de las recompensas florales

El volumen de néctar producido varió a lo largo del día y varió según el tipo de flor y variedad (Cuadro 2). Taha y Bayoumi, (2009) hallaron que las flores estaminadas de sandía producen más néctar (9,52 mg/flor) que las flores pistiladas (14,64 mg/flor) en

sandía diploide. Hasta el momento no se había realizado una comparación también en cultivares triploides.

Cuadro 2. Resultado del Modelo Lineal (Análisis de devianza tipo III) para el volumen de néctar (variable respuesta), en función de la hora del día, tipo de flor y variedad de sandía (variables independientes).

	S. C.	G. L.	F-valor	Pr (>F)
Intecept	1,992	1	74,896	< 0,0001 ***
Variedad	0,869	1	32,668	< 0,0001 ***
Tipo de flor	0,171	1	6,419	0,0117 *
Hora del día	12,6223	2	237,281	< 0,0001 ***
Variedad * Tipo de flor	1,144	1	42,995	< 0,0001 ***
Tipo de flor * Hora	0,569	2	10,697	< 0,0001 ***
Variedad * Hora	0,660	2	12,406	< 0,0001 ***
Residuos	9,309	350		

La producción de néctar no fue constante a lo largo del día (Figura 7). La producción fue muy escasa a primera hora de la mañana, siendo menor en la variedad diploide (0,7 μ l estaminadas y 1,2 μ l pistiladas) que en la triploide (1,8 μ l estaminadas y 5,1 μ l pistiladas). Progresivamente, se detectó mayor cantidad de néctar, que sobresalía en ocasiones de la parte basal de la flor. A mediodía, la producción era máxima en todas las flores estudiadas. Sin embargo, durante este período también se observó menor cantidad de néctar en las flores diploides (estaminadas: 8,8 μ l; pistiladas: 18,0 μ l) que en las triploides (estaminadas: 10,4 μ l; pistiladas: 31,7 μ l). El pronunciado aumento de néctar a partir de mediodía puede explicarse por las altas temperaturas y humedad relativa alcanzadas en esos momentos en el interior del invernadero (Corbet et al., 1979; Dafni et al., 2005). Posteriormente a este pico, se detectó un descenso en la producción de néctar, antes del cierre de la flor. Al igual que en los períodos anteriores del día, la producción de néctar era inferior en las plantas diploides (estaminadas: 7,2 μ l; pistiladas: 11,1 μ l) que en las triploides (estaminadas: 7,2 μ l; pistiladas: 20,1 μ l).

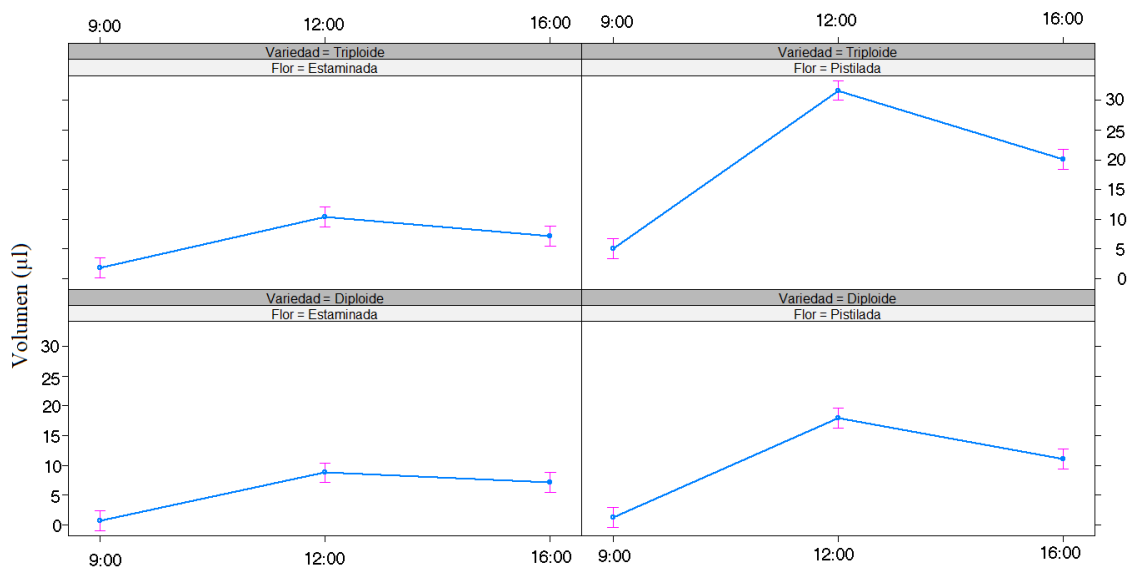


Figura 7. Evolución de la producción de néctar en las flores pistiladas y estaminadas de ambos cultivares de sandía a lo largo del día.

En relación al polen, se registraron diferencias significativas entre variedades ($t = 2,53$; $df = 21,99$; $p = 0,0190$). La variedad diploide produjo más número de granos de polen que la variedad triploide (42.477 ± 12.515 vs 29.894 ± 12.424 granos). En este sentido, Stanghellini y Schultheis (2005) encontraron grandes diferencias en el número de granos de polen entre flores, variando de 26.000 a 38.000 granos por flor, y entre plantas (de 134.206 a 264.589). Stanghellini et al. (2002) establecieron un promedio de 30.739 granos de polen por flor, sin diferencias entre cultivares diploides y triploides. Contrariamente, Bomfim et al. (2015) observaron incluso visualmente que algunas anteras del cultivar triploide presentaban menos polen. En nuestro caso, el cultivar triploide también mostró menos granos de polen por flor que el cultivar diploide.

Aunque no hay demasiada información sobre las características del polen diploide y triploide, recientes publicaciones indican que son distinguibles (Subasinghe-Arachchige et al., 2022) En nuestro caso, se observó que los granos de polen eran más homogéneos en la variedad diploide mientras que en la triploide había mayor variabilidad de tamaño y forma (Figura 8).

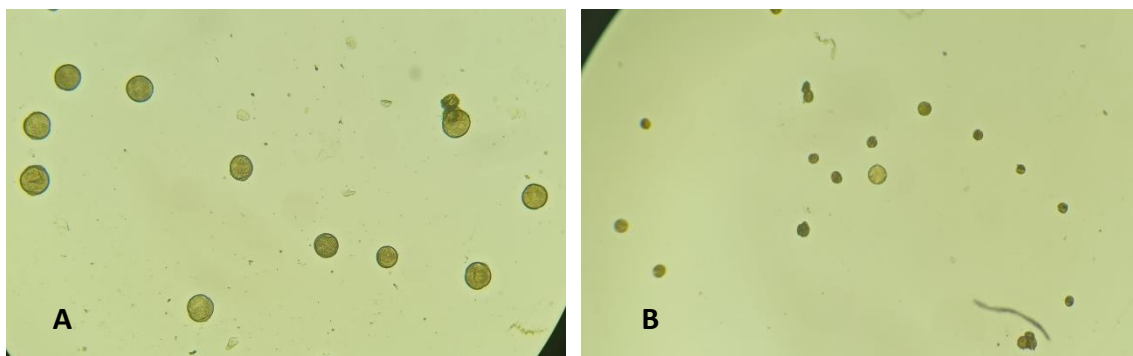


Figura 8. Polen del cultivar diploide (A) y triploide (B) bajo microscopía x10

Caracterización nutricional de las recompensas florales

En el polen se registraron 30 metabolitos presentes en ambos cultivares. Los metabolitos correspondían a carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), aminoácidos (GABA, glutamina, prolina, valina, isoleucina, leucina, lisina, treonina, alanina, fenilalanina, aspargina, triptófano, histidina), ácidos orgánicos (acético, málico, fórmico, succínico, láctico, quínico, fumárico), flavonoides (derivados de quercitina y miricetina), alcoholes (isopropanol, myo-inositol), nucleósidos (adenosina y uridina), y derivados de la colina. Se encontraron también ácidos grasos, aminoácidos aromáticos y metabolitos secundarios (trigonellina). Entre todos los metabolitos, destacaron algunos esenciales para los polinizadores, como la glutamina, isoleucina, leucina, prolina y valina (De Groot, 1952; Gilbert, 1985). Con el objetivo de comparar la composición del polen entre cultivares, se llevó a cabo un modelo OPLS-DA que confirmó la existencia de diferencias significativas (Figura 9).

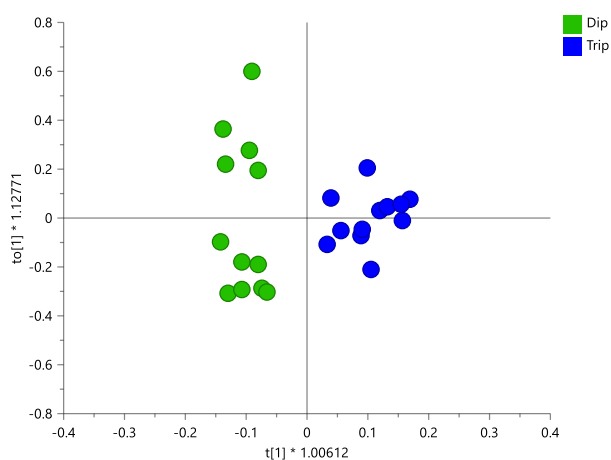
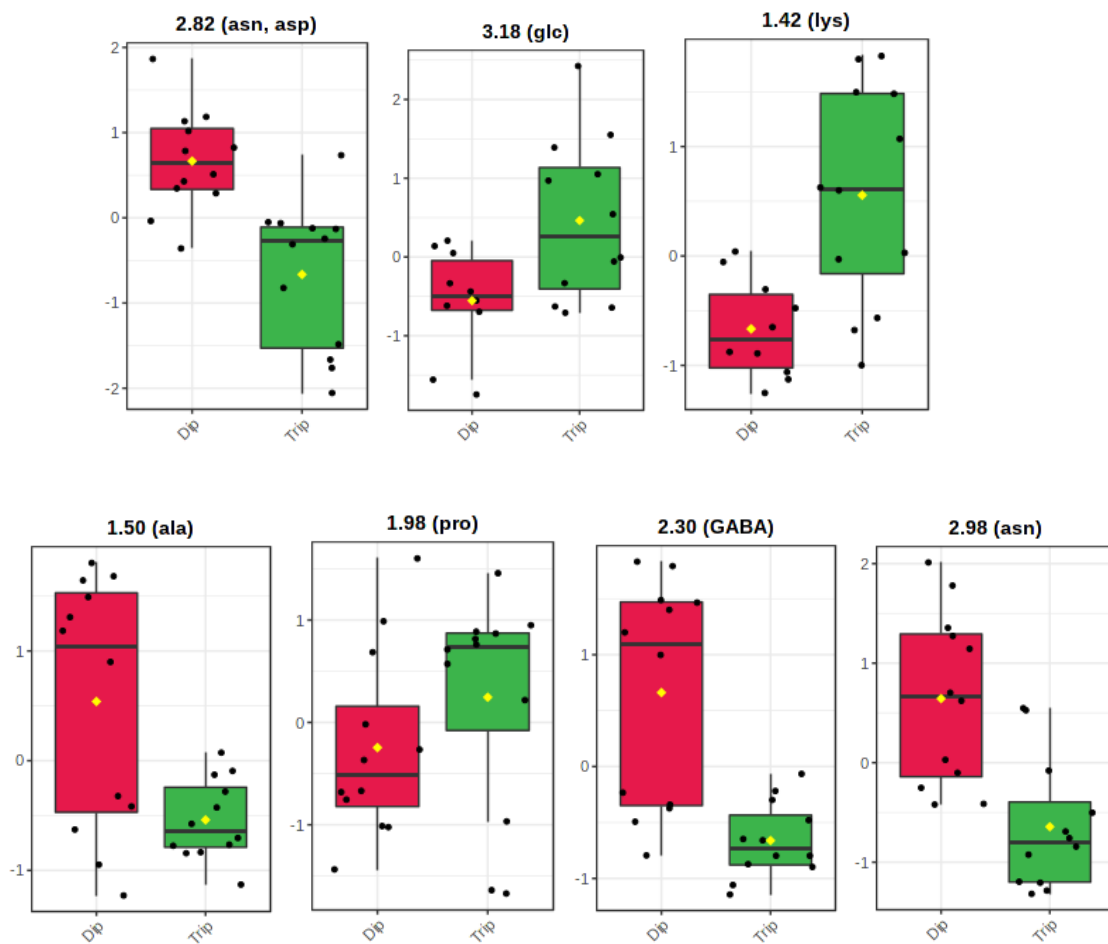


Figura 9. Representación de OPLS-DA obtenidos para los datos de polen de flores diploides (verde) y triploides (azul)

En este sentido, se observó que el polen de las plantas diploides era más rico en algunos aminoácidos (GABA, leucina, alanina, asparagina, aspartato), ácidos orgánicos (ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico), mio-inositol y ácidos grasos. En cambio, el polen de las flores triploides era más rico en azúcares (glucosa y fructosa), prolina y lisina (Figura 10). Tal y como indican Freeman y Olson (2007), el cultivar diploide presenta polen más rico en lípidos. Esto se deposita en la exina de los granos de polen de flores entomófilas determinando el olor de su polen y ejerciendo de este modo una atracción en los insectos (Pacini y Hesse, 2005).



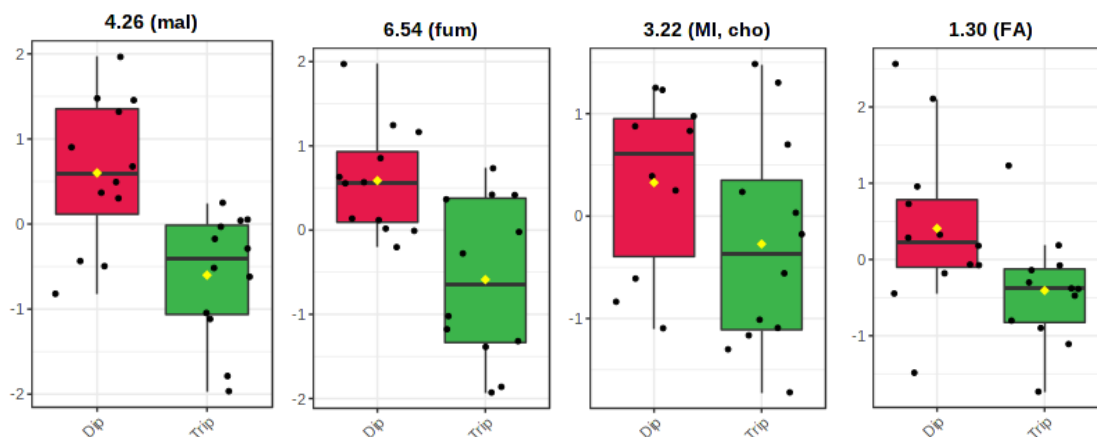


Figura 10. Boxplots de la concentración de los principales metabolitos diferenciados en el polen del cultivar diploide y triploide.

El néctar es la principal recompensa calorífica de las flores para los polinizadores, dependiendo su valor energético del volumen y concentración de azúcares (Dafni et al., 2005; Nicolson et al., 2007). En el néctar de sandía se identificaron los mismos 20 metabolitos en las flores pistiladas y estaminadas de ambos cultivares, diploide y triploide. Estos metabolitos pertenecían a los grupos de carbohidratos (glucosa, fructosa y sacarosa), aminoácidos (GABA, valina, isoleucina, leucina, alanina, glutamina, fenilalanina, treonina), ácidos orgánicos (malato, succinato, acetato, formato, fumarato y ácido siquínico), alcoholes (etanol y propanol) y derivados de la colina. Este néctar también podría contener parte del exudado estigmático, que contiene polisacáridos, fructosa, glucosa, sacarosa y ácidos grasos, siendo la sacarosa el principal azúcar libre (Hawker et al., 1983). El exudado estigmático tiene como función la adhesión e hidratación del polen, pero también atrae a los insectos hacia las flores pistiladas (Vogel, 1978; Sedgley y Scholefield, 1980; Sedgley y Blesing, 1982).

En las muestras recogidas en este ensayo, se hallaron diferencias significativas en la composición del néctar de flores pistiladas y estaminadas, sin considerar cultivar o período del día ($R^2X = 0,94$; $Q^2 = 0,971$; p (CV-ANOVA) = $5,6 \times 10^{-13}$). En este caso, los resultados indican que el néctar de flores pistiladas contenía mayor cantidad de glucosa y fructosa, que las estaminadas, que presentaban por su parte mayor cantidad de sacarosa. Además, el néctar de las flores pistiladas también tenía más treonina y ácido siquínico, frente a las estaminadas, que presentaron más GABA, succinato, valina, leucina y alanina. Los aminoácidos, entre los que destacan GABA y fenilalanina, actúan como fagoestimulantes e influyen en la atracción de las flores y en la nutrición de los

insectos (Dafni y Kevan, 1994; Gardener y Gillman, 2002; Afik et al., 2006; Petanidou et al., 2006; Nicolson y Thornburg, 2007; Nepi, 2013).

La comparación del néctar de las dos variedades diferentes mostró diferencias significativas en las flores pistiladas ($R^2X = 0,97$; $Q^2 = 0,995$; p (CV-ANOVA) $< 0,0001$), pero no en las estaminadas ($R^2X = 0,98$; $Q^2 = 0,938$; p (CV-ANOVA) $= 0,090$). El néctar de las flores pistiladas triploides mostró mayor contenido en succinato, alanina, valina y leucina y una disminución de treonina, en comparación con las flores pistiladas diploides. La comparación del néctar de las flores estaminadas no fue totalmente válida, debido tal vez a las propias diferencias del néctar en función de la hora del día.

La comparación de los metabolitos del néctar en función de la hora del día mostró diferencias significativas ($R^2X = 0,94$; $Q^2 = 0,938$; p (CV-ANOVA) $< 0,0001$). El néctar recolectado a final del día registró mayor concentración de glucosa y fructosa, ácidos orgánicos, como malato y fumarato, y aminoácidos, como GABA y leucina. Destaca, además, un marcado aumento del ácido siquímico en la tarde en las flores pistiladas, mientras que en las flores estaminadas destacó un aumento de la glutamina y fenilalanina. Durante la mañana se observó un mayor contenido de sacarosa.

El análisis de componentes principales (ACP) indicó que los principales criterios de agrupación entre muestras de néctar corresponden a los diferentes periodos de recogida del mismo (Figura 11). Esto sucedió independientemente de si el néctar pertenecía a flores pistiladas o estaminadas, de variedades diploides o triploides, discriminándose especialmente el néctar recolectado por la tarde, frente al resto de muestras (Figura 11).

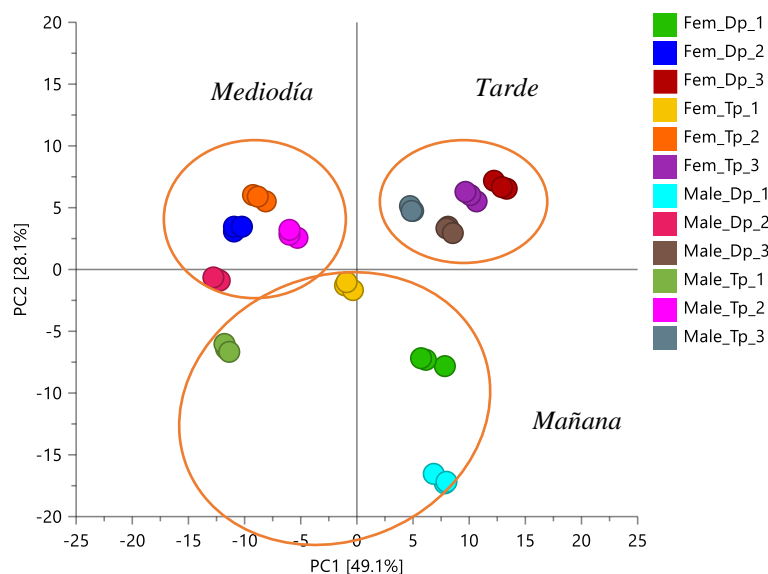


Figura 11. Gráfico PC1/PC2 del PCA obtenido para los datos de RMN ¹H de los extractos de néctar de las flores de sandía recogidos en 3 periodos del día.

En el caso de las flores pistiladas, la mayor discriminación se produce también entre los distintos periodos de recogida de la muestra (mañana, mediodía o tarde), independientemente de la variedad diploide o triploide. Además, la discriminación entre flores diploides o triploides es más acentuada durante la mañana, para ambos tipos de flores, pistilada versus estaminada (Figura 12).

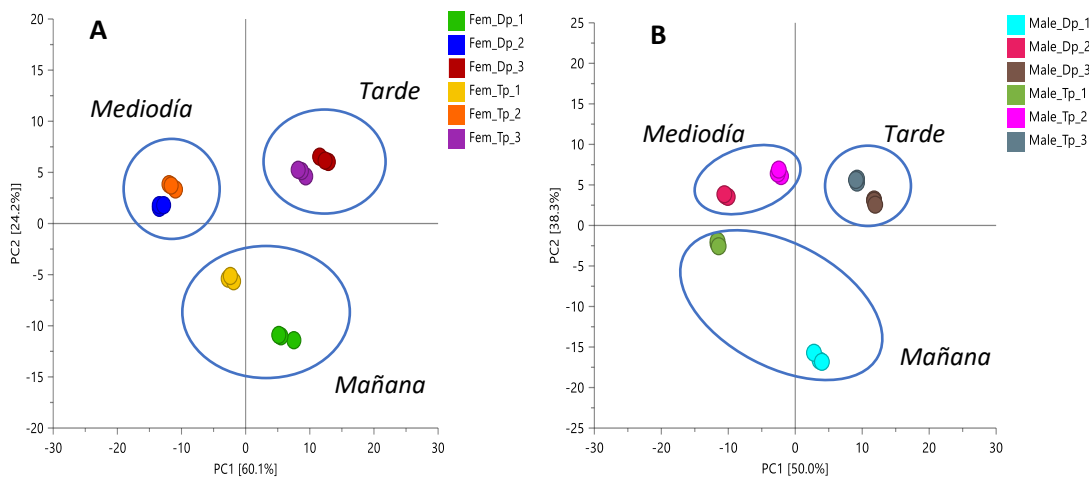


Figura 12. Gráfico PC1/PC2 PCA obtenidas para los datos de RMN ¹H de los extractos de néctar de (A) flores pistiladas y (B) flores estaminadas de sandía, diploides y triploides, recogidas en 3 periodos del día.

De este análisis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El néctar recogido durante la tarde de las flores diploides pistiladas y de las flores estaminadas (diploides y triploides) mostró un mayor contenido de GABA, alanina, succinato, malato, fenilalanina, valina, glutamina, leucina e isoleucina;
- El néctar recogido por la tarde de las flores pistiladas (diploides y triploides) fue más rico en glucosa, fructosa, propanol, etanol y ácido siquímico y más pobre en sacarosa;
- El néctar recogido por la tarde de flores diploides pistiladas tenía el contenido metabólico más rico de todas las muestras, mientras que el néctar de flores triploides estaminadas recogido por la mañana tenía el contenido metabólico más pobre;
- El néctar de flores estaminadas (diploides y triploides) recogido por la mañana y, en menor medida, al mediodía, fue más rico en sacarosa;
- El néctar de flores pistiladas (triploides y diploides) recogido por la tarde y, en menor medida, al mediodía, fue más rico en glucosa y fructosa;
- Los ácidos fórmico y acético fueron los más altos en el néctar de las flores diploides estaminadas y pistiladas (en menor medida) recogido por la mañana, mientras que la treonina mostró un pico en el néctar de las flores triploides pistiladas recogido también por la mañana.

En resumen, las flores de sandía se ajustan a lo que se espera en especies entomófilas, siendo una de las evidencias principales su polen grande y pegajoso. La forma de la flor plana, discoidal, y con una marcada orientación hacia arriba, junto con sus recompensas florales, la hace atractiva para un amplio grupo de insectos, entre los que se incluyen los sírfidos (Waser, 1983; Rotheray y Gilbert, 2011). Diferentes estudios han encontrado que las abejas melíferas (*Apis mellifera* L. o *A. cerana* L.) son el visitante más común de las flores de sandía. No obstante, otras publicaciones muestran que los dípteros son el segundo grupo más importante de insectos en este cultivo al aire libre (Taha y Bayoumi, 2009; Campbell et al., 2019). Este capítulo ha medido los atractivos y recompensas que los dípteros pueden hallar en sus visitas a las flores de este cultivo.

4. Bibliografía

Abreu, A.C., Mora, S., Tristán, A.I., Martín-González, E., Prados-Pardo, Á., Moreno, M., Fernández, I. 2022. NMR-based metabolomics and fatty acid profiles to unravel biomarkers in preclinical animal models of compulsive behavior. *Journal of Proteome Research* 21: 612-622.

- Adlerz, W.C. 1966. Honeybee visit numbers and watermelon pollination1. *Journal of Economic Entomology* 59: 28-30.
- Afik, O., Dag, A., Kerem, Z., Shafir, S. 2006. Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 32: 1949-1963.
- Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., Freitas, B.M., Aragão, F.A.S. de. 2015. Pollination requirements of seeded and seedless mini watermelon varieties cultivated under protected environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50: 44-53.
- Campbell, J.W., Stanley-Stahr, C., Bammer, M., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2019. Contribution of bees and other pollinators to watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) pollination. *Journal of Apicultural Research* 58: 597-603.
- Castro-López, A.J., García, E., Caballero, T.M., Linares, L., Piñar, A., Rivas, N., Santillán, N.V. et al. 2013. Seedless watermelons: from the microscope to the table through the greenhouse. *High School Students for Agricultural Science Research*, 27-32.
- Corbet, S.A., Willmer, P.G., Beament, J.W.L., Unwin, D.M., Prÿs-Jones, O.E. 1979. Post-secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant, Cell & Environment* 2: 293-308.
- Dafni, A., Kevan, P. 1994. An hypothesis on complementary amino acids in nectar. *Evolutionary Theory* 10: 259-260.
- Dafni, A., Kevan, P., Husband, B. 2005. *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Ontario, Canada.
- De Groot, A.P. 1952. Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experientia* 8: 192-194.
- Delaplane, K.S., Mayer, D.F. 2000. *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing Series, Wallingford, United Kingdom.
- Emuh, F., Ojeifo, I. 2012. The phenology of flowering in *Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf. in southwestern Nigeria. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 5: 2031.
- Freeman, J.H., Miller, G.A., Olson, S.M., Stall, W.M. 2007. Diploid watermelon pollenizer cultivars differ with respect to triploid watermelon yield. *HortTechnology* 17: 518-522.
- Freeman, J.H., Olson, S.M. 2007. Variability in watermelon flower attractiveness to insect pollinators. *Proc. Fla. State Hort. Soc* 120: 199-203.
- Galen, C., Plowright, R.C. 1985. Contrasting movement patterns of nectar-collecting and pollen-collecting bumble bees (*Bombus terricola*) on fireweed (*Chamaenerion angustifolium*) inflorescences. *Ecological Entomology* 10: 9-17.
- Gardener, M., Gillman, M. 2002. The taste of nectar - A neglected area of pollination ecology. *Oikos* 98 (3): 552-557.
- Gilbert, F.S. 1985. Diurnal activity patterns in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Ecological Entomology* 10: 385-392.
- Goff, C.C. 1937. Importance of bees in the production of watermelons. *The Florida Entomologist* 20: 30-31.
- Guerra-Sanz, J.M. 2008. Crop pollination in greenhouses. En *Bee Pollination in Agricultural Ecosystems*, Oxford University Press, New York.
- Harder, L.D., Thomson, J.D. 1989. Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants. *The American Naturalist* 133: 323-344.

- Mann, L.K. 1943. Fruit shape of watermelon as affected by placement of pollen on stigma. *Botanical Gazette* 105: 257-262.
- Maynard, D.N., Elmstrom, G.W. 1992. Triploid watermelon production practices and varieties. *Acta Horticulturae* 169-178.
- Nepi, M. 2013. Beyond nectar sweetness: the hidden ecological role of non-protein amino acids in nectar. *Journal of Ecology* 102: 108-115.
- Nicolson, S.W., Thornburg, R.W. 2007. Nectar chemistry. En Nicolson, S. W., Nepi, M., Pacini, E. (eds.), *Nectaries and Nectar*, pp. 215-264. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.W. 2004. Pollination ecology of *Citrullus lanatus* at Yatta, Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science* 24: 73-77.
- Pacini, E., Hesse, M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 200: 399-415.
- Petanidou, T., Van Laere, A., N. Ellis, W., Smets, E. 2006. What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos* 115: 155-169.
- Rotheray, G.E., Gilbert, F.S. 2011. *The Natural History of Hoverflies*. Forrest Text, Wales, UK.
- Schaffer, A.A., Paris, H.S. 2016. Melons, Squashes, and Gourds. En *Reference Module in Food Science*, pp. B9780081005965033000. Elsevier.
- Sedgley, M., Blesing, M.A. 1982. Foreign pollination of the stigma of watermelon (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum and Nakai). *Botanical Gazette* 143: 210-215.
- Sedgley, M., Scholefield, P.B. 1980. Stigma secretion in the watermelon before and after pollination. *Botanical Gazette* 141: 428-434.
- Silberglied, R.E. 1979. Communication in the ultraviolet. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 373-398.
- Stanghellini, M., Schultheis, J. 2005. Genotypic variability in staminate flower and pollen grain production of diploid watermelons. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science* 40: 752-755.
- Stanghellini, M.S., Schultheis, J.R., Ambrose, J.T. 2002. Pollen mobilization in selected cucurbitaceae and the putative effects of pollinator abundance on pollen depletion rates. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 729-736.
- Subasinghe-Arachchige, E.C.W., Evans, L.J., Samnegård, U., Rader, R. 2022. Morphological characteristics of pollen from triploid watermelon and its fate on stigmas in a hybrid crop production system. *Scientific Reports* 12: 3222.
- Taha, E.-K.A., Bayoumi, Y.A. 2009. The value of honeybees (*Apis mellifera*, L.) as pollinators of summer seed watermelon (*Citrullus lanatus colothyntoides* L.) in Egypt. *Acta Biologica Szegediensis* 53 (1): 33-37.
- Thomson, J.D. 1986. Pollen transport and deposition by bumblebees in *Erythronium*: Influences of floral nectar and bee grooming. *Journal of Ecology* 74: 329-341.
- Tristán, A.I., Abreu, A.C., Aguilera-Sáez, L.M., Peña, A., Conesa-Bueno, A., Fernández, I. 2022. Evaluation of ORAC, IR and NMR metabolomics for predicting ripening stage and variety in melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry* 372: 131263.

Vogel, S. 1978. Floral Ecology. En Ellenberg, H., Esser, K., Merxmüller, H., Schnepf, E., Ziegler, H. (eds.), *Progress in Botany/Fortschritte der Botanik*, Progress in Botany/Fortschritte der Botanik, pp. 453-481. Springer, Berlin, Heidelberg.

Walters, S.A. 2005. Influence of honeybee pollination on triploid watermelon fruit set and quality. *HortScience* 40 (4): 1268-1270.

Waser, N.M. 1983. The adaptive nature of floral traits: Ideas and evidence. En Real, L. A. (ed.), *Pollination Biology*, pp. 241-285. Academic Press, Orlando.

Wein, H.C. 1997. The cucurbits: cucumbers, melon, squash, pumpkin. En Wein, H. C. (ed.), *The physiology of vegetable crops*, pp. 345-386. CAB International, New York, NY.

Wijesinghe, S.A.E.C., Evans, L.J., Kirkland, L., Rader, R. 2020. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Scientia Horticulturae* 271: 109493.

Wolf, S., Lensky, Y., Paldi, N. 1999. Genetic variability in flower attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.) within the genus *Citrullus*. *HortScience* 34: 860-863.

CAPÍTULO VI: LA INTERACCIÓN
PLANTA-POLINIZADOR DE *ERISTALINUS*
***AENEUS* EN EL CULTIVO DE SANDÍA**



1. Introducción

Los cultivos que dependen de insectos para su polinización tienen una gran importancia económica y agronómica (Klein et al., 2007). Este es el caso de la sandía. La sandía es una cucurbitácea polinizada exclusivamente por insectos cultivada en todo el mundo (FAOSTAT, 2021). Se trata de un cultivo monoico, en el que aparecen tanto flores masculinas como femeninas en la misma planta. Las flores estaminadas están compuestas por tres estambres con gran cantidad de polen, y un nectario poco profundo en la base interna de la corola. La flor pistilada presenta un ovario prominente, con un estilo grueso y corto rodeado en la base por un nectario poco profundo. En la parte superior del estilo aparece un estigma grande con exudado copioso, dividido en tres o cuatro grandes lóbulos (Bomfim et al., 2015). Sus flores, al igual que sucede en el resto de cucurbitáceas, tienen una breve receptividad, comenzando su apertura en la mañana y permaneciendo abiertas solo 8-9 horas al día (Bomfim et al., 2015).

Las flores de las sandías requieren la transferencia de los granos de polen de la flor masculina hacia la femenina a través de vectores bióticos, insectos sobre todo. Estas flores son visitadas por abejas, avispas, hormigas, mariposas, dípteros y escarabajos (McGregor, 1976; Free, 1993; Stanghellini et al., 1998; Delaplane y Mayer, 2000; Njoroge et al., 2004, 2010; Taha y Bayoumi, 2009; Garantonakis et al., 2016; Campbell et al., 2018). Sin embargo, muchos de estos insectos no se consideran polinizadores del cultivo porque, aunque recogen puntualmente los recursos florales, lo hacen sin entrar en contacto con los órganos reproductivos. Al mismo tiempo, estos insectos no visitan consistentemente sus flores, o no transportan polen viable a las flores femeninas, contribuyendo de este modo poco o nada a la producción de frutos (Dafni et al., 2005). Las investigaciones en este ámbito muestran que el visitante más común y extendido a las flores de la sandía es la abeja melífera (Wijesinghe et al., 2020), tanto en cultivo protegido como al aire libre. Sin embargo, durante los últimos años se está produciendo un acelerado declive de los insectos polinizadores, que supone un serio desafío para los cultivos donde es indispensable la polinización entomófila como sucede en la sandía.

Por otra parte, el constante crecimiento de los cultivos protegidos hace necesario el estudio de polinizadores que muestren capacidades de adaptación a las condiciones ambientales del invernadero. El cultivo protegido, ya sea bajo plástico o bajo malla, genera barreras físicas que impiden o dificultan en gran medida el acceso de polinizadores

silvestres, siendo de obligado uso el manejo de polinizadores comerciales. La abeja melífera y otros himenópteros muestran dificultades para adaptarse a estas condiciones, lo que afecta a su forrajeo (Dag, 2008; Kendall et al., 2021). Dada la importancia económica y social del cultivo de la sandía es necesaria la selección de polinizadores alternativos que realicen una eficaz transferencia de polen entre flores estaminadas y pistiladas y ofrezcan resultados óptimos en el cuajado de frutos. En ese sentido, el sírfido *Eristalinus aeneus* muestra buenas cualidades para ser considerado ‘a priori’ como polinizador de la sandía, debido a sus características y a su presencia natural en zonas con alta temperatura y humedad (Marcos-García, 1985; Pérez-Bañón, 2000; Speight, 2011).

El objetivo de este capítulo es establecer el patrón de actividad de *E. aeneus* en dos períodos del día en relación con las condiciones ambientales del invernadero. Al mismo tiempo, se presta especial atención a su forrajeo, determinándose posibles preferencias florales mediante la determinación del número de visitas a ambos tipos de flores (pistiladas y estaminadas) para dos cultivares (uno diploide y otro triploide).

2. Materiales y métodos

2.1. Ubicación del ensayo y material biológico

El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental Fundación Cajamar sita en El Ejido (Almería, España) (36°47'42.0"N, 2°43'19.4"W) durante la primavera de 2020 (Figura 1). El invernadero era tipo multitúnel con una superficie de 630 m², con 22,5 m de anchura y 28,0 m de largo. La estructura contaba con ventilación pasiva mediante ventanas laterales (norte y sur) y cenitales en cada capilla del invernadero, con malla anti-insectos de 20 x 10 hilos cm⁻². El invernadero estaba constituido por tres capillas de 7,5 m orientadas en dirección E-O, con una altura de canaleta de 3,0 m y 4,5 m en cumbre y cubierta plástica tricapa no fotoselectiva.

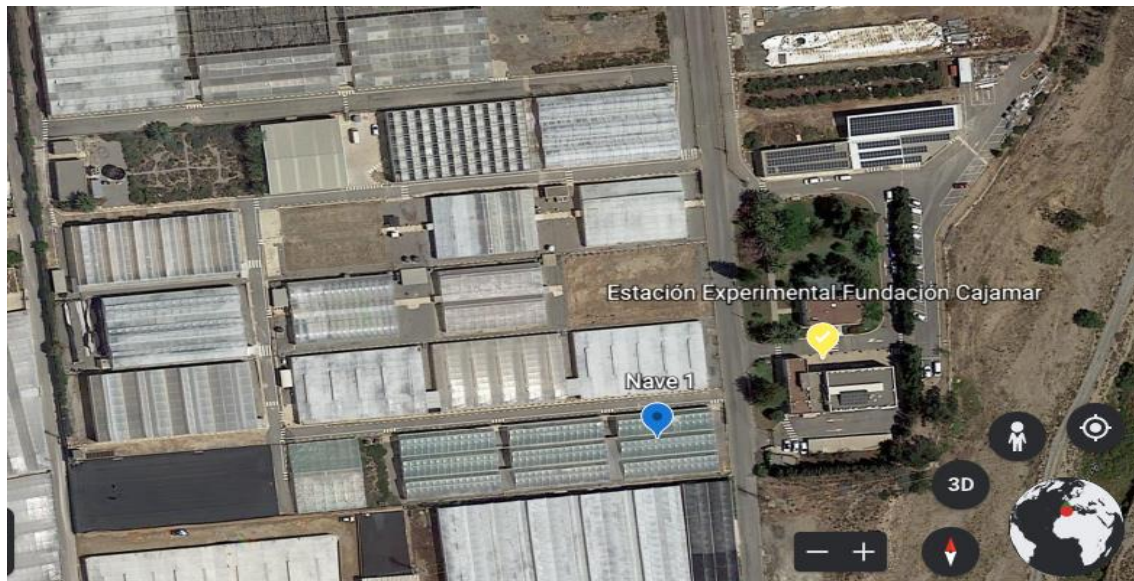


Figura 1. Fotografía aérea de la ubicación de la Estación Experimental Fundación Cajamar y nave en la que se desarrolló el ensayo.

La plantación de sandía correspondía con la variedad comercial Premium (cultivar diploide) y Fashion (cultivar triploide), con una ratio de plantación 1:3, y un marco de plantación de 0.25 plantas/m². El manejo del cultivo fue realizado según las recomendaciones técnicas de la Estación Experimental Fundación Cajamar. La introducción del sírfido *E. aeneus* en el cultivo fue realizada en una única suelta el 19 de abril de 2020, tras la aparición de las primeras flores femeninas (Figura 2). La densidad de suelta fue aproximadamente de 30 individuos/m², correspondiente a unas 20.000 pupas. La emergencia de las pupas dio comienzo dos días después de su introducción en el invernadero. El porcentaje de pupas emergidas al final del ensayo fue del 93%.



Figura 2. Salida de los primeros adultos de *E. aeneus* tras la introducción en el invernadero en forma de pupa.

El registro de los datos climáticos de temperatura y humedad dentro del invernadero se llevó a cabo con un aspirópsicrómetro ventilado de bulbo seco y bulbo húmedo ventilado, con una sonda PT-100. La gestión del clima se realizó mediante un controlador climático (PRIVA B.V., De Lier, Países Bajos), que registraba la información y gestionaba la apertura y cierre de bandas laterales y ventanas cenitales, con una temperatura de consigna de apertura para la ventilación de 26 °C. Las temperaturas medias, mínimas y máximas, al igual que la HR registradas durante el ensayo, y mientras se observó actividad polinizadora, se representan en las figuras 3 y 4.

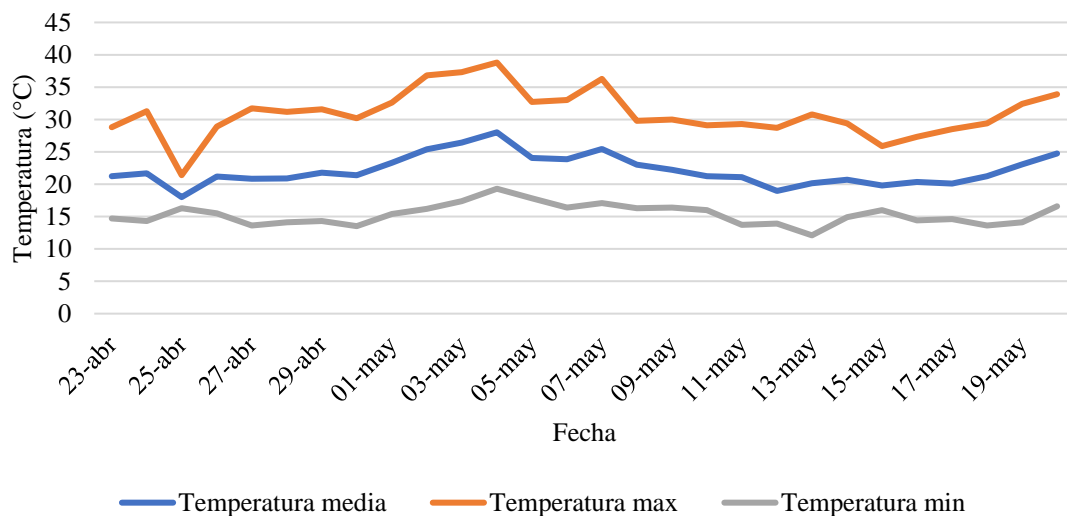


Figura 3. Registro de temperaturas (°C) durante el ensayo. Líneas representadas de temperaturas medias, mínimas y máximas.

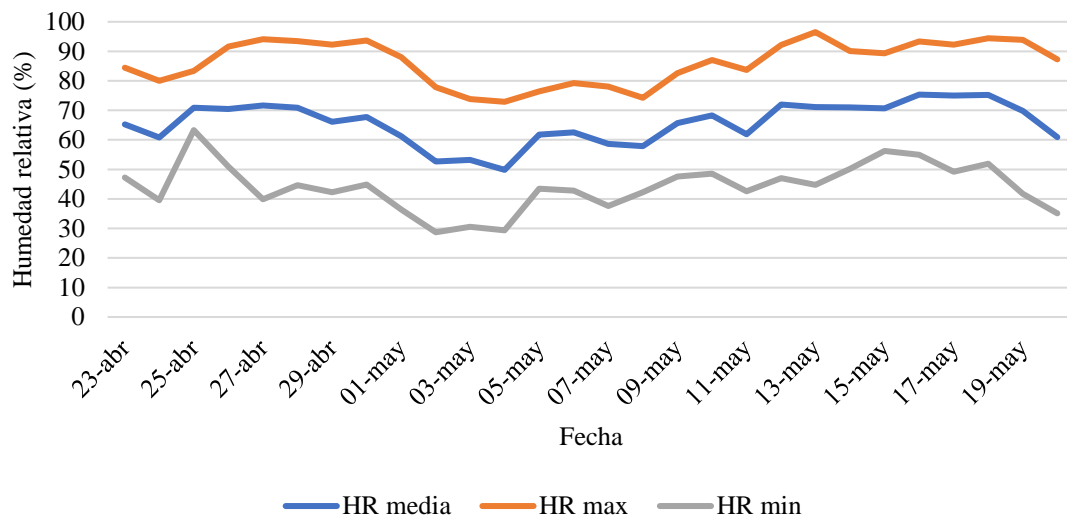


Figura 4. Registro de humedad relativa (%) durante el ensayo. Las líneas representan la HR media, mínima y máxima.

2.2. Parámetros evaluados

Actividad diaria de los sírfidos

El primer parámetro de importancia en la evaluación de un potencial polinizador es su actividad diaria. Para ello se hizo un seguimiento detallado registrando el número de sírfidos en vuelo. Las observaciones se realizaron siempre desde el mismo punto, estableciendo un cuadrante de 2 m² localizados entre plantas de sandía. Se realizaron observaciones de cinco minutos de duración en cada hora, desde las 7:00 hasta las 18:00 (UTC+02:00), durante seis días no consecutivos a lo largo del período de floración, es decir, entre el 27/04 y el 06/05 de 2020. En cada observación se procedió a la medida de la intensidad lumínica en el interior del invernadero con un luxómetro de mano (Mastech MS6612), tomándose 20 medidas repartidas a la altura de la planta. Posteriormente, se calculó la media.

Comportamiento

El comportamiento del insecto sobre el cultivo de sandía fue caracterizado gracias al seguimiento de seis individuos seleccionados al azar, durante cinco minutos en dos períodos diferentes del día, de 9:30 a 10:30, y de 15:30 a 16:30, durante cinco días no consecutivos. Las actividades fueron clasificadas como forrajeo, aseo, vuelo, caminar y reposar. Se determinó el tiempo empleado en cada actividad. La actividad de forrajeo se consideró cuando el insecto extendía su probóscide y entraba en contacto con los órganos de la flor, ya fuera en búsqueda de polen en las anteras, o de néctar en los nectarios, haciéndose distinción entre ambos.

Preferencias florales

Para determinar la existencia o no de preferencias florales por parte del sírfido, se realizaron observaciones de las visitas recibidas durante cuatro días no consecutivos en ambos tipos de flor (pistiladas y estaminadas) y en ambos cultivares (diploides y triploides) anotándose el recurso consumido (polen o néctar). Las observaciones fueron realizadas dos veces al día, de 9:00 a 9:30, y de 15:00 a 15:30, sobre la misma flor, durante tres minutos. Se registró el número de visitas y la duración de las mismas en tres flores de cada tipo, con un total de 48 flores.

2.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con R Statical Software (R-Core Team, Vienna, Austria, versión 4.3.1). La actividad diaria de vuelo fue evaluada mediante un *LMM* (Modelo Lineal Mixto) con el paquete “lme4” (Bates et al., 2021). El número de individuos fue previamente transformado en raíz cuadrada e incluido en el modelo como la variable respuesta. La hora del día fue incluida como factor fijo y la fecha de observación como factor aleatorio. Los efectos de los factores ambientales sobre la actividad del sírfido se evaluaron distinguiendo los dos períodos del día: mañana (07:00 – 15:00), y tarde (15:00 – 18:00), debido al cambio de comportamiento observado. Para ello, se llevó a cabo un *GLM* (Modelo Lineal General), donde los factores ambientales fueron incluidos como variables independientes (temperatura, humedad relativa y radiación). Previamente, a la variable respuesta (número de individuos en vuelo) se le realizó una transformación en raíz cuadrada para lograr la normalidad de los datos. El valor obtenido en la R^2 condicional con el paquete “sqrt” fue tomado como métrica de calidad del modelo. Todos los modelos finales fueron seleccionados comparando el AIC (*Akaike Information Criterion*) de los modelos completos. Con el fin de no violar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, todos los modelos fueron evaluados mediante *Q-Q plots* e histogramas con el paquete “DHARMA”.

El comportamiento de *E. aeneus* fue comparado a lo largo del día mediante test de Kruskal-Wallis y Chi-cuadrado para cada período del día, para establecer posibles diferencias en función del momento del día observado. Además, durante la actividad de forrajeo, tanto el tipo de flor como la recompensa floral fueron analizadas con Goodness-of-fit, y Kruskal-Wallis para determinar posibles preferencias florales (pistiladas o estaminadas), la duración de la visita y el tipo de recompensa (polen o néctar).

Finalmente, para establecer el número y duración de visitas entre los diferentes tipos de flores (estaminadas y pistiladas) de ambos cultivares (diploides y triploides), se desarrolló un test Kruskal-Wallis, comparando las visitas realizadas por la mañana y por la tarde.

3. Resultados

Actividad diaria de los sírfidos

El período activo de este sírfido en el cultivo de sandía fue superior a 10 horas diarias. La actividad de vuelo estuvo relacionada de manera significativa con la hora del día ($F_{5,55} = 142,85$; $p < 0,0001$; $R^2c = 0,92$). Así, el patrón diario de vuelo de *E. aeneus* mostró una actividad bimodal, con dos picos de máxima actividad, y pronunciadas diferencias entre horas (Figura 5). El inicio de actividad se observó entre las 8:00 y las 9:00, incrementándose progresivamente hasta alcanzar el primer máximo entre las 11:00 y las 12:00. En este primer pico de actividad se observó un promedio de $17,3 \pm 0,7$ individuos/m² en vuelo. Posteriormente, y de manera progresiva, se observó una disminución de los sírfidos en vuelo, hasta alcanzar un valor bajo entre las 14:00 y 15:00. No obstante, transcurrido este período se observó de nuevo un incremento en el número de individuos activos hasta alcanzar un segundo pico de actividad, entre las 16:00 y 17:00, para, finalmente, disminuir la actividad a partir de las 18:00 (Figura 5).

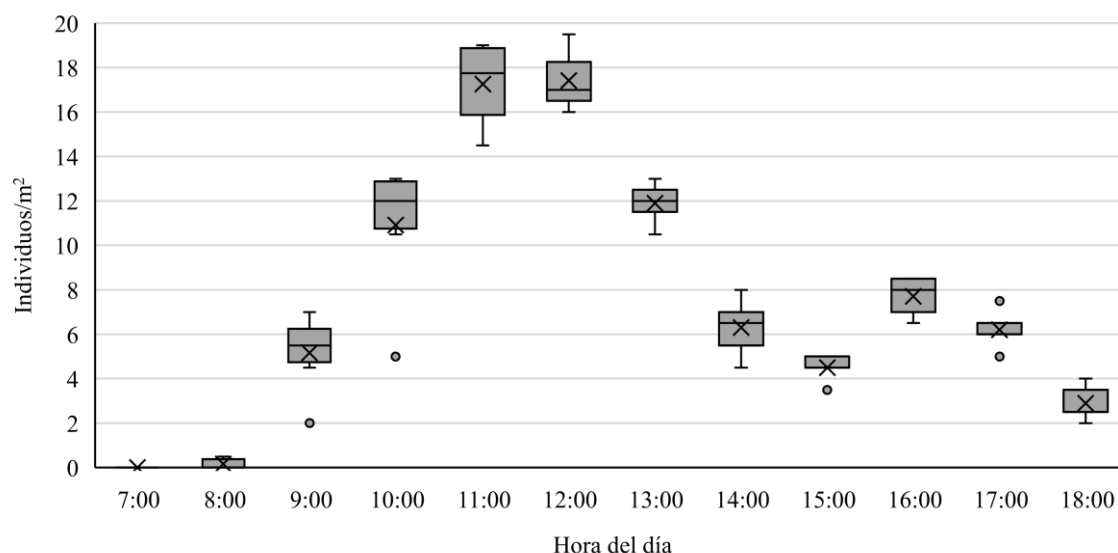


Figura 5. Diagrama de cajas y bigotes con la representación de los rangos de número de individuos/m² de *Eristalinus aeneus* en vuelo en relación a la hora de observación.

Los cambios observados en el patrón bimodal a lo largo del día en la actividad de vuelo del polinizador estuvieron relacionados con los factores ambientales en el interior del invernadero. Durante la primera parte del día, todos los factores ambientales afectaron a la actividad de vuelo de este insecto ($R^2c = 0,93$), al igual que sucedió durante la segunda parte del día ($R^2c = 0,87$). Durante el inicio del vuelo, las condiciones ambientales registradas fueron en promedio $5,2 \pm 0,2$ klux de radiación, $25,8 \pm 1,1$ °C de temperatura y $53,4 \pm 5,8$ % de humedad relativa. Durante la última medición de actividad, coincidiendo con el cierre floral, las condiciones ambientales fueron $29,5 \pm 1,5$ klux, $24,7$

$\pm 2,3$ °C de temperatura, y $55,7 \pm 7,6$ % de humedad relativa (Figura 6). *Eristalinus aeneus* se mantuvo activo, con un mínimo de 10 individuos/m², en un amplio rango de condiciones ambientales de temperatura, radiación y humedad relativa: 27,1 – 36,7 °C; 9,2 – 72,3 klux and 29,0 – 57,2%, respectivamente (Figura 6).

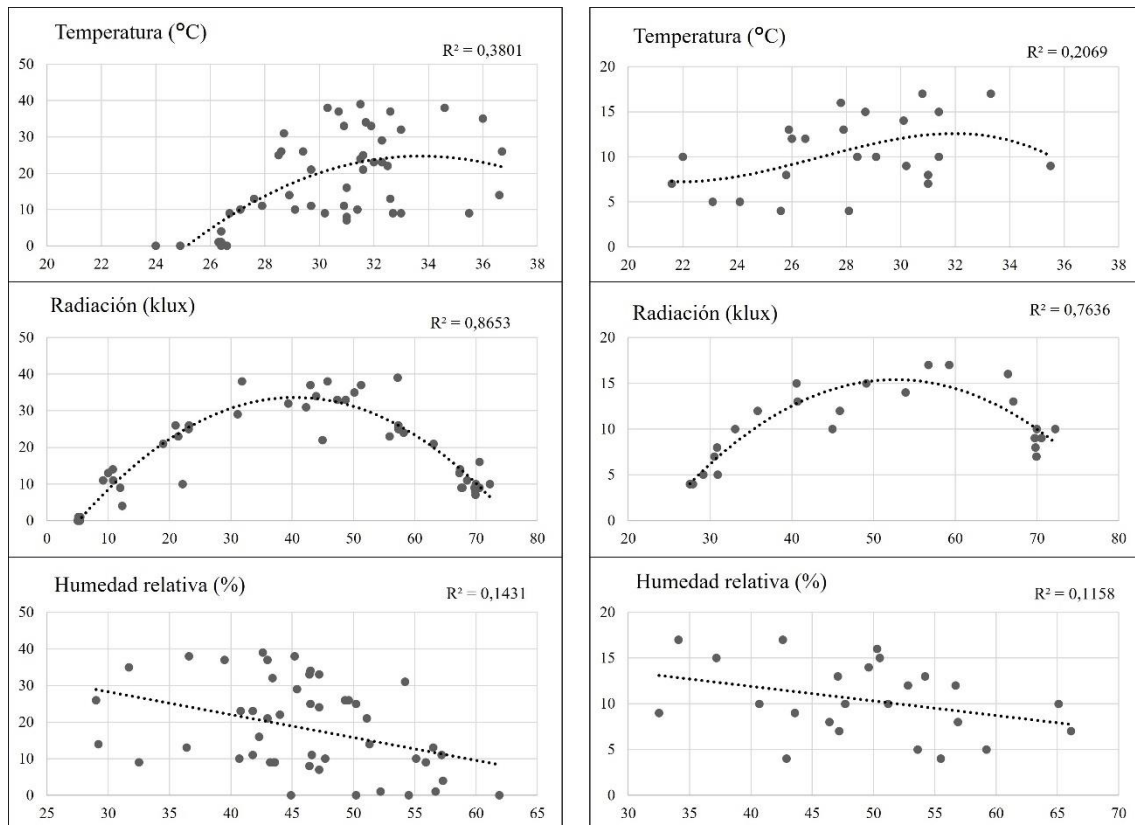


Figura 6. Modelos de regresión entre el número de individuos en vuelo (eje y) y las condiciones de temperatura, radiación y humedad relativa (eje x), durante el período de la mañana (izquierda) y la tarde (derecha).

Los efectos de los factores ambientales en la actividad de vuelo de *E. aeneus* fueron diferentes según el período del día. Las variables con efectos significativos durante la primera parte del día se muestran en el Cuadro 1. Durante esta primera parte del día (07:00 – 15:00), la luminosidad mostró un patrón unimodal, registrándose al inicio del día 1,0 klux y aumentando acusadamente hasta alcanzar un pico de 70,4 klux a las 15:00. Este parámetro presentó una relación cuadrática con el número de individuos en vuelo, de modo que afectó de manera positiva a la actividad de vuelo inicialmente, pero negativamente cuando se alcanzaron valores superiores a 40,0 – 50,0 klux. En el caso de la temperatura, se observó un incremento de temperatura desde los 21,3 hasta los 32,8 °C

durante este primer período del día. Este incremento progresivo incentivó la activación del vuelo de *E. aeneus* a primera hora de la mañana. Sin embargo, temperaturas superiores a los 32,0 – 34,0 °C tuvieron efectos negativos sobre el número de individuos en vuelo. Por último, el parámetro ambiental de humedad relativa registró variaciones del 63,4 % a las 08:00, hasta alcanzar un mínimo a las 14:00 con el 39,4 %. La humedad relativa fue el factor ambiental que en menor medida afectó al vuelo de este polinizador en estas condiciones de cultivo.

Cuadro 1. Modelo lineal generalizado de la actividad del sírfido E. aeneus en relación a las condiciones ambientales durante la primera fase del día.

Modelo primera etapa del día (07:00 – 15:00), AIC inicial = 200,07; AIC final = 111,14				
Coefficientes	Estimate	S.E.	t valor	Pr (> t)
Intercept	18,1700	6,6120	-2,747	0,00849 **
Temperatura	0,6287	0,2284	2,753	0,00836 **
Humedad relativa	0,2205	0,0921	2,393	0,02074 *
Radiación	0,4402	0,0676	6,513	<0,0001 ***
Radiación^2	-0,0030	0,0003	-9,029	<0,0001 ***
Temperatura*Radiación	-0,0065	0,0026	-2,528	0,01489 *
Temperatura * HR	-0,0073	0,0033	-2,231	0,03049 *

Durante la segunda etapa del día (15:00 – 18:00), también se pudo determinar un efecto significativo de las variables ambientales sobre la actividad de vuelo de *E. aeneus* (Cuadro 2). Al igual que sucedió durante la primera parte del día, la radiación fue el factor que afectó en mayor medida al comportamiento de vuelo de este insecto. Se observó que a medida que la radiación disminuía de los valores máximos registrados durante las 15:00, la actividad de vuelo volvía a incrementarse (Figura 7). El máximo valor de este parámetro se alcanzó a las 15:00, con un valor de 70,4 klux, para disminuir progresivamente hasta 29,5 klux. Sin embargo, los valores mínimos registrados durante la última observación de vuelo no determinaron una nula actividad de vuelo (Figura 7). Respecto a la temperatura, durante este periodo de tiempo, los valores decrecieron desde los 31,4 a 24,7 °C. El descenso de temperatura no marcó de manera significativa la actividad de los sírfidos. Por último, los valores de humedad relativa aumentaron desde 43,0 al 55,7% durante la última observación. Esta pequeña variación hizo que la humedad relativa no resultara un factor ambiental significativo en la actividad de vuelo del sírfido.

Cuadro 2. Modelo lineal generalizado de la actividad del sírfido *E. aeneus* en relación a las condiciones ambientales durante la segunda fase del día.

Modelo segunda etapa del día (15:00 – 18:00); AIC inicial = 54,25; AIC final = 28,63				
Coefficientes	Estimate	S.E.	t valor	Pr (> t)
Intercept	-71,6300	29,4900	-2,429	0,0273 *
Temperatura	3,9300	1,7380	2,261	0,0380 *
Temperatura ^2	-0,0528	0,0252	-2,100	0,0519
Humedad relativa (HR)	0,5362	0,2447	2,191	0,0436 *
Radiación	0,2746	0,0652	4,214	0,0007 ***
Radiación^2	-0,0025	0,0005	-5,335	<0,0001***
Temperatura*Radiación	-0,0002	0,0030	-0,068	0,9469
Temperatura * HR	-0,0193	0,0087	-2,228	0,0406 *

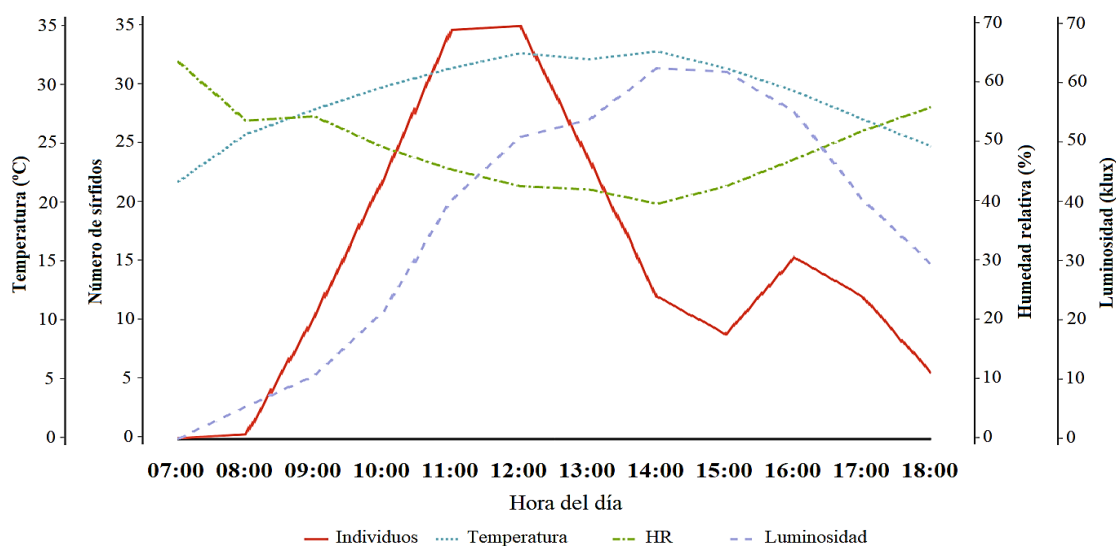


Figura 7. Número de sírfidos en vuelo en relación con las condiciones ambientales para cada hora del día durante el período de observación.

Comportamiento

Tras su emergencia de la pupa en forma de adulto, los sírfidos desarrollaron su actividad realizando constantes visitas a flores e interactuando entre ellos alrededor del cultivo. Se observaron interacciones como cópulas, competencia entre machos tanto por intentos de cópulas con hembras, como lucha con otros machos por espacio. También se observaron otros comportamientos como la búsqueda de refugio bajo las hojas de sandía en horas de condiciones ambientales extremas.

Se realizó el seguimiento a un total de 48 individuos, 24 durante la mañana, y 24 durante la tarde. Se detectaron 5 tipos de actividades: forrajeo, reposo, caminar, vuelo y aseo, que se repetía en la mayoría de los individuos tanto por la mañana como por la tarde. Se registraron un total de 1.647 movimientos, de los cuales 540 fueron de forrajeo, 465 de vuelo, 331 de reposo, 180 de caminar por hojas y flores, y 131 de aseo y acicalamiento del cuerpo. El porcentaje de movimientos respecto al total no mostró una distribución homogénea ($\chi^2 = 24,283$; $df = 4$; $p < 0,0001$), siendo la actividad de forrajeo la que mayor número registró (34,7%), seguido del vuelo (26,6%), reposo (19,7%), caminar (10,5%) y aseo (8,4%).

El tiempo destinado a cada actividad mostró diferencias significativas ($\chi^2 = 87,028$; $df = 4$; $p < 0,0001$), siendo la principal la de forrajeo (Figura 8). Por tanto, el porcentaje de tiempo activo, que incluyó todas las actividades a excepción del reposo, fue superior al 80%, mientras que menos del 20% del tiempo fue de descanso (Figura 8).

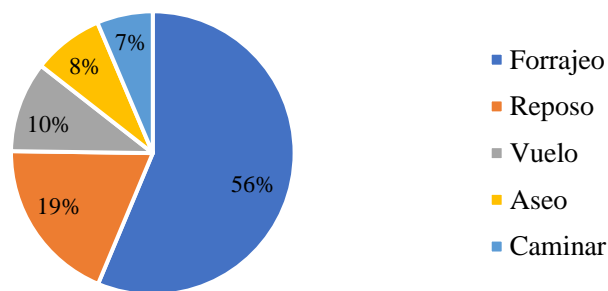


Figura 8. Tiempo invertido (%) en cada actividad de *E. aeneus* durante las observaciones.

La duración de las actividades fue similar a lo largo del día, mostrando ligeras diferencias entre los dos períodos de observación ($\chi^2 = 2,914$; $df = 5$; $p = 0,7133$). El forrajeo y el descanso fueron las dos principales actividades tanto por la mañana como por la tarde. Cabe destacar que el término descanso incluye los pequeños reposos durante el resto de las actividades, entre las que destacan paradas durante la alimentación con polen y néctar. Por otra parte, el vuelo fue la tercera actividad durante la mañana, a diferencia de la tarde, cuando destinaron más tiempo al aseo (Figura 9). En ambos períodos del día, la actividad en la que invirtieron menor tiempo fue a caminar, entre las flores o en las hojas. Tanto por la mañana como por la tarde, *E. aeneus* se mantuvo activo, con un 81,3% y 78,5%, respectivamente. La mayoría de los movimientos realizados por

los sírfidos, aunque no se tratara de forrajeo, se realizaba sobre las flores, como caminar o el aseo, lo que facilita también la dispersión de polen (Figura 10).

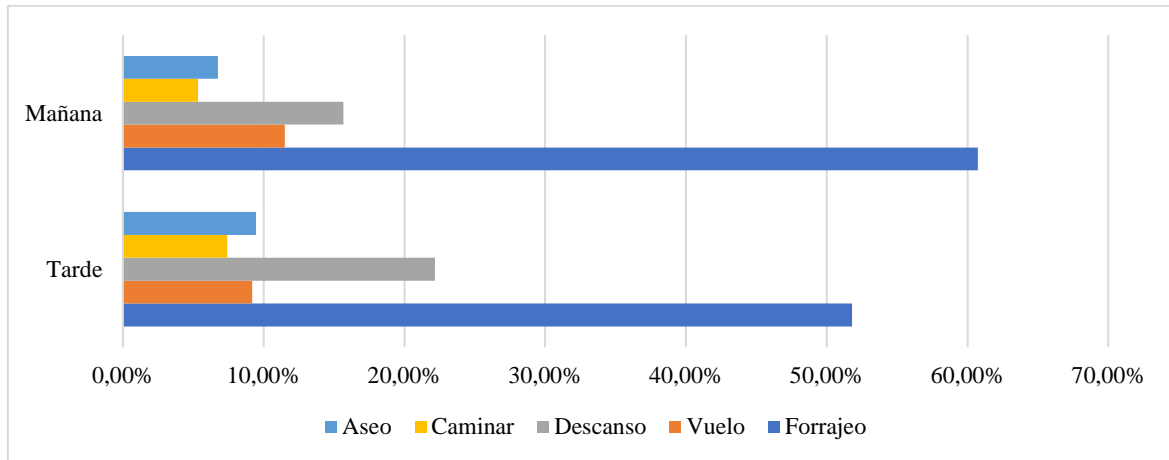


Figura 9. Tiempo invertido (%) durante la mañana y la tarde en cada actividad durante la observación de *E. aeneus*.



Figura 10. Macho de *E. aeneus* durante la actividad de aseo en contacto con el estigma de la flor pistilada

En relación a la distancia de vuelo, se observó que *E. aeneus* se desplazaba mayor distancia durante la mañana (3,75 m) que durante la tarde (3,05 m) en los 5 minutos de observación, pero sin diferencias significativas ($\chi^2 = 0,3685$; $df = 1$; $p = 0,5438$). Estos desplazamientos los hacía en todas las direcciones, y mostró también otro tipo de vuelos como el sostenido (“hovering”), para acercarse hacia la flor o hacia la hoja para el reposo. El vuelo sostenido también lo realizaban los machos para acercarse a las hembras en intento de cópula, o para el ataque a otros machos por territorialidad.

El comportamiento de forrajeo de *E. aeneus* se caracterizó por un alto número de visitas, tanto a flores pistiladas como a estaminadas, en búsqueda de néctar y polen. La llegada a las flores las realizaba tras un aterrizaje después del vuelo, o caminando entre las hojas desde una flor a otra. El forrajeo, correspondiente a la alimentación como tal, se distinguía claramente, ya que para alimentarse extendía prominentemente su probóscide, hasta entrar en contacto con las grandes anteras de la flor de la sandía, o hasta alcanzar los nectarios en la base de la flor. Una vez comenzada esta actividad de alimentación, el sírfido recorría la flor con movimientos circulares, en torno al pistilo o al estambre. La toma de polen permitía, debido a su mayor exposición en las anteras, que el sírfido permaneciera en la parte más externa de la flor, manteniendo su cuerpo en contacto con las anteras. En algunas ocasiones también se observó que la probóscide entraba en contacto con los pétalos de las flores estaminadas, debido a la gran cantidad de polen que se desprendía de las anteras y caían en ese órgano floral. Cuando *E. aeneus* consumía néctar, su probóscide se extendía repetidamente hasta alcanzar la base de la flor, donde se ubican los nectarios.

Durante el seguimiento de los individuos, se registró un promedio de $5,6 \pm 1,8$ flores visitadas durante los cinco minutos de observación, siendo superior el número de flores durante la mañana que durante la tarde (6,2 versus 5,0). Las visitas se realizaban tanto a flores masculinas como femeninas, aunque fue imposible determinar en campo si se trataba de flores de variedades diploides o triploides. No obstante, sí se pudo comprobar que un mismo individuo, durante el tiempo de observación, visitaba ambos tipos de flores en un mismo recorrido.

El número de flores pistiladas visitadas fue de 1,7 flores/5 minutos, frente a las 3,9 flores/5 minutos en el caso de estaminadas. El mayor número de visitas a flores estaminadas se debe al mayor número de flores masculinas presentes en el cultivo (ratio de 1:6; ver Capítulo 5). No se observó, por tanto, una preferencia floral marcada por ningún tipo de flor ($\chi^2 = 0,6689$; $df = 1$; $p = 0,4134$). *Eristalinus aeneus* realizó 1,8 visitas a flores pistiladas y 4,3 a flores estaminadas/5 minutos durante la mañana. Durante la tarde, el número de visitas descendió levemente, hasta valores de 1,5 flores pistiladas y 3,5 flores estaminadas durante los 5 minutos de actividad. Por tanto, la distribución de las visitas entre los tipos de flores se mantuvo durante la mañana y la tarde, con aproximadamente un 30% de visitas realizadas a flores pistiladas y un 70% a flores

estaminadas, no habiendo diferencias significativas entre ambos períodos ($\chi^2 = 0,0001$; $df = 1$; $p = 0,9911$).

Los sírfidos se alimentaban tanto de polen y néctar en flores estaminadas, como de néctar en flores pistiladas. En general, el número de veces que tomó el recurso floral de polen fue superior a las veces que se alimentó de néctar ($\chi^2 = 14,169$; $df = 1$; $p = 0,0002$), teniendo en cuenta que tan sólo la flor estaminada ofrece ambas recompensas florales. En el caso de las flores estaminadas, *E. aeneus* se alimentó más veces sobre polen que sobre néctar, mostrando preferencia hacia este primer recurso, tanto por la mañana ($\chi^2 = 14,065$; $df = 1$; $p = 0,0002$) como por la tarde ($\chi^2 = 5,3895$; $df = 1$; $p = 0,0203$) (Figura 11).

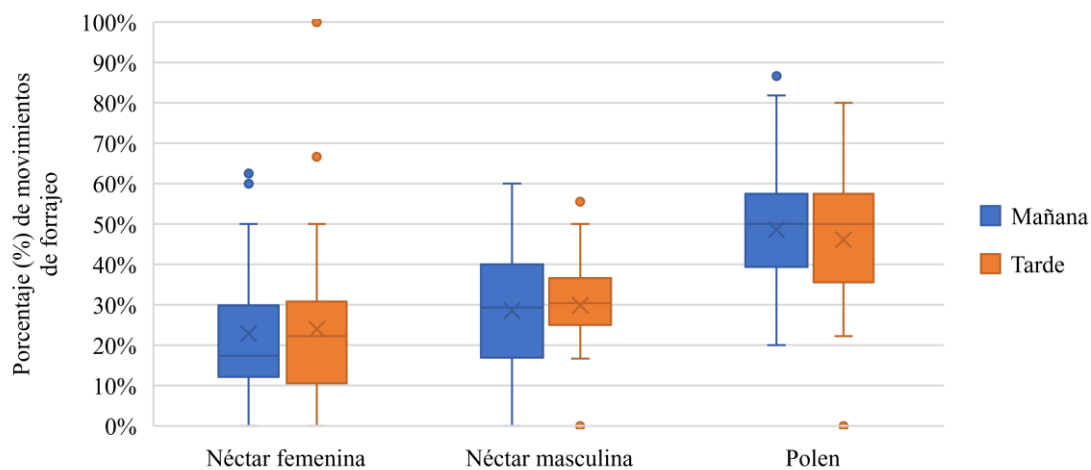


Figura 11. Diagrama de cajas y bigotes representando los movimientos (%) para obtener diferentes recursos florales durante la mañana y la tarde.

Respecto a la duración de su alimentación sobre polen, el tiempo que *E. aeneus* invirtió en consumir exclusivamente polen fue significativamente diferente en función del período del día ($\chi^2 = 9,7263$; $df = 1$; $p = 0,0018$), siendo superior durante la mañana. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de alimentación de *E. aeneus* sobre polen o sobre néctar en las flores estaminadas ($\chi^2 = 0,0051$; $df = 1$; $p = 0,9431$). Sin embargo, el tiempo que estuvo alimentándose de néctar fue diferente entre flores pistiladas vs estaminadas ($\chi^2 = 8,6089$; $df = 1$; $p = 0,0033$), siendo superior el tiempo invertido en flores pistiladas. El tiempo de alimentación en base a néctar no fue significativamente superior en las flores pistiladas con respecto a las estaminadas por la

mañana ($\chi^2 = 2,4196$; $df = 1$; $p = 0,1198$) pero sí por la tarde ($\chi^2 = 6,7834$; $df = 1$; $p = 0,0092$) (Figura 12).

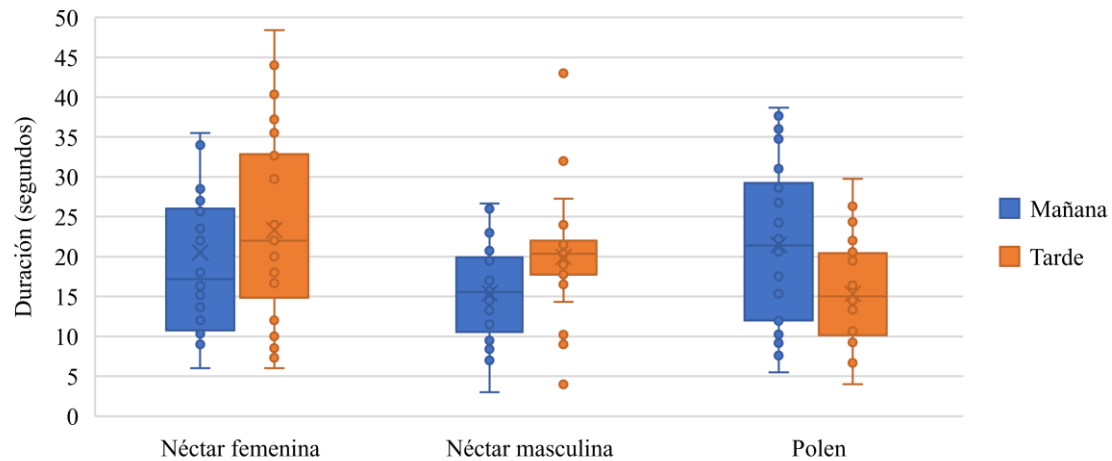


Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes representando la duración de la alimentación en los diferentes recursos florales durante la mañana y la tarde

Comparación de las visitas florales entre cultivares

Se registró un total de 249 visitas en las 48 flores observadas durante cinco minutos. El número de visitas recibidas no varió ni en flores pistiladas ($\chi^2 = 0,058$; $df = 1$; $p = 0,8105$), ni en las estaminadas ($\chi^2 = 0,064$; $df = 1$; $p = 0,8003$) en ninguno de los dos cultivares, no estableciéndose de este modo preferencias florales. Así, en la variedad diploide, no hubo diferencias significativas en el número de visitas recibidas en ambos tipos de flores, pistilada y estaminada ($\chi^2 = 2,561$; $df = 1$; $p = 0,1095$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la variedad triploide ($\chi^2 = 1,533$; $df = 1$; $p = 0,2156$).

Por último, se encontró que el número de visitas estuvo relacionado significativamente con la hora de observación, siendo superior en la mañana. En el caso de la variedad diploide, hubo más visitas durante la mañana ($\chi^2 = 26,944$; $df = 1$; $p < 0,0001$), tanto en flores pistiladas ($\chi^2 = 10,037$; $df = 1$; $p = 0,0015$) como estaminadas ($\chi^2 = 16,826$; $df = 1$; $p < 0,0001$). En el cultivar triploide, también se observó que la hora de observación fue un factor significativo en el número de visitas recibidas por las flores ($\chi^2 = 15,761$; $df = 1$; $p < 0,0001$). Este patrón se observó en flores pistiladas ($\chi^2 = 4,856$; $df = 1$; $p = 0,0276$) y estaminadas ($\chi^2 = 11,179$; $df = 1$; $p = 0,0008$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Visitas recibidas (promedio \pm SE, máximos y mínimos entre paréntesis) en las flores, realizadas por *E. aeneus* en los dos cultivares y tipos de flores, en período de mañana y tarde. Observaciones de 5 minutos.

	Variedad diploide		Variedad triploide	
	09:00 – 9:30	15:00 – 15:30	09:00 – 9:30	15:00 – 15:30
F. pistiladas	3,33 \pm 0,89 (2 – 4)	2,08 \pm 0,51 (1 – 3)	3,08 \pm 0,99 (2 – 5)	2,17 \pm 0,72 (1 – 3)
F. estaminadas	3,33 \pm 0,65 (2 – 4)	1,75 \pm 0,45 (1 – 2)	3,17 \pm 0,94 (2 – 5)	1,83 \pm 0,57 (1 – 2)

Así mismo, se analizó la duración de las visitas florales. El tiempo de visita no mostró diferencias según sexo de la flor ($\chi^2 = 0,0003$; $df = 1$; $p = 0,9951$), ni variedad ($\chi^2 = 0,015$; $df = 1$; $p = 0,9012$), ni hora del día ($\chi^2 = 1,785$; $df = 1$; $p = 0,1815$). En la variedad diploide, el sírfido no mostró diferencias en la duración de las visitas según el tipo de flor ($\chi^2 = 0,056$; $df = 1$; $p = 0,8128$) u hora de visita ($\chi^2 = 0,791$; $df = 1$; $p = 0,3738$). En el caso de la variedad triploide, tampoco hubo diferencias en la duración de las visitas en función del tipo de flor ($\chi^2 = 0,082$; $df = 1$; $p = 0,7749$) o la hora del día ($\chi^2 = 1,136$; $df = 1$; $p = 0,2866$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Duración de las visitas recibidas (promedio \pm SE, tiempo máximo y mínimo entre paréntesis) en las flores, realizadas por *E. aeneus* en los dos cultivares y tipos de flores, durante la mañana y la tarde.

	Variedad diploide		Variedad triploide	
	09:00 – 9:30	15:00 – 15:30	09:00 – 9:30	15:00 – 15:30
F. pistiladas	50,80 \pm 27,74 (7 – 129)	56,28 \pm 43,48 (4 – 210)	50,11 \pm 34,80 (8 – 177)	53,38 \pm 32,65 (15 – 168)
F. estaminadas	54,48 \pm 53,68 (5 – 300)	64,00 \pm 55,86 (17 – 273)	52,68 \pm 40,39 (10 – 219)	57,05 \pm 35,21 (8 – 118)

4. Discusión

Eristalinus aeneus ha demostrado en este ensayo su capacidad de adaptación a las condiciones ambientales en el interior del invernadero durante un cultivo de primavera de sandía en el sureste español. Además de su adaptación a las condiciones extremas de este sistema de producción, ha mostrado un comportamiento de forrajeo óptimo, sin preferencias según el tipo de flor y con alto número de visitas florales, lo cual es considerado fundamental en los polinizadores efectivos (Rader et al., 2009; Ne’eman et al., 2010). Estos dos factores avalan su potencial como polinizador del cultivo de sandía protegido.

Respecto a su comportamiento, *E. aeneus* llevó a cabo cinco actividades principales: forrajeo, reposo, vuelo, aseo y caminar. El mayor tiempo se destinó al forrajeo, con un 56%, seguido de reposo, vuelo, aseo y caminar (Figura 8 y 9). Otras especies de la tribu Eristalini muestran datos similares, oscilando el tiempo de forrajeo entre el 73,7 y 84,5% (Gilbert, 1985). Se observó que el tiempo dedicado a cada actividad variaba ligeramente con el transcurso de las horas (Figura 9), debido a que el comportamiento de los polinizadores cambia a lo largo del día según condiciones ambientales o disponibilidad de recursos (Szabo, 1980; Sihag y Abrol, 1986; Comba, 1999; Inouye et al., 2015).

En el cultivo protegido de sandía, las condiciones ambientales óptimas que deben ocurrir durante la floración son temperaturas en torno a 20 – 25 °C, HR de 60 - 75% y altos valores de intensidad lumínica (Reche, 1994). En este ensayo, la temperatura media superó los 25 °C, pero no hubo problemas en el cuajado de frutos (Capítulo 8), por lo que cabe asumir que la actividad polinizadora fue efectiva a pesar de las altas temperaturas. *E. aeneus* mantuvo su actividad de vuelo y forrajeo en un alto rango de temperatura, humedad y radiación; por tanto, las condiciones ambientales de este cultivo protegido no resultaron negativas sobre la actividad polinizadora del sírfido. Por el contrario, algunas publicaciones subrayan la incapacidad de adaptación de las abejas en ciertos cultivos de invernadero, principalmente debido a falta de alimento, condiciones ambientales extremas y desarrollo en espacios cerrados. Esto puede repercutir negativamente sobre la producción y calidad de los frutos (Heinrich, 1979; Vogt, 1986; Dag y Eisikowitch, 1995; Vaissière y Froissart, 1996; Occhiuzzi, 1999; Kwon y Saeed, 2003; Amano, 2004; Dag, 2008; Bomfim et al., 2014; Evans et al., 2019; Descamps et al., 2021; Kendall et al., 2021).

E. aeneus muestra un patrón bimodal de vuelo en el cultivo de sandía, común en otros sírfidos en ambientes naturales y que se explica por el efecto de las condiciones ambientales (Willmer, 1983; Gilbert, 1985; Herrera, 1990; Ssymank, 1991). El principal pico de actividad del sírfido *E. aeneus* se registró entre las 10:00 y 13:00, observándose un segundo pico de actividad, con menor intensidad, entre las 16:00 y 17:00. Aunque los vuelos de *E. aeneus* continuaban después de las 17:00, el cierre de las flores provocó una disminución de la actividad polinizadora, aunque las condiciones ambientales podían ser aún favorecedores de la misma. Azo'o et al. (2020) observaron en *Xylocopa olivacea* un pico de actividad en sandía de 07:00 a 08:00 y en *Apis mellifera* entre las 09:00 y 10:00,

aunque otros autores muestran este único pico de actividad aún más temprano (Araújo et al., 2014). En cualquier caso, los registros de actividad de los himenópteros en sandía muestran un único pico de actividad a primera hora, tras el cual desciende drásticamente su actividad (Wolf et al., 1999; Araújo et al., 2014; Bomfim et al., 2014; Kiill et al., 2014; Azo'o et al., 2020). Esto es importante porque, como señala Adlerz (1996), se obtiene un cuajado de frutos cuando la polinización sucede entre las 9:00 y 10:00, pudiéndose extender este periodo hasta mediodía (Emuh y Ojeifo, 2012). Durante ese período del día, *E. aeneus* destina la mayor parte de su tiempo al forrajeo, realizando constantes visitas florales en busca tanto de polen como de néctar, en ambos cultivares por igual, sin mostrar preferencia por flores masculinas o femeninas (Figura 7, Figura 9, Cuadro 3).

Debido a que la sandía es un fruto multise millado, se requiere un alto número de visitas florales para lograr una gran deposición de polen de modo homogéneo en los tres lóbulos estigmáticos y por consiguiente, un fruto simétrico (Mann, 1943; Adlerz, 1966; Maynard, 1989; Free, 1993; Stanghellini et al., 1998; Delaplane et al., 2000). Diferentes publicaciones indican que son necesarias entre 10 y 60 visitas a las flores pistiladas de sandía para asegurar el cuajado y calidad de los frutos (Adlerz, 1966; Stanghellini et al., 1997; Walters, 2005; Winfree et al., 2007). Otro punto importante es que los polinizadores en sandía no deben mostrar preferencias florales hacia cultivares que presenten menor cantidad de polen o néctar, o incluso hacia líneas que contengan polen no viable frente al viable, como es el caso de los cultivares triploides de sandía. Las ratios oscilaron entre 41,6 y 66,6 visitas/h en flores pistiladas, y entre 35,0 y 66,6 visitas/h en estaminadas, dependiendo del período del día (Cuadro 3). Esta ratio fue similar a los registrados para *A. mellifera* en sandía al aire libre (Njoroge et al., 2004). También se determinó que la distancia y dirección de vuelo de *E. aeneus* era óptimo para facilitar el transporte de polen entre las plantas donadoras de polen fértil y las flores pistiladas y receptoras de polen viable para su cuajado.

Respecto a la duración de las visitas florales, en este ensayo se registraron duraciones superiores a 50 s, sin diferencias entre tipo de flor o cultivar (Cuadro 4). Estos resultados son similares a los obtenidos para abejas mineras (57 s), pero no para abejas melíferas u otras abejas sin aguijón, donde los tiempos de visita son más breves ya que oscilan, según el tipo de flor, entre 6 y 19 segundos (Njoroge et al., 2004; Araújo et al., 2014; Bomfim et al., 2014; Garantonakis et al., 2016; Campbell et al., 2019), siendo superior en flores pistiladas.

El número y la duración de las visitas florales varía en función de la disponibilidad de polen y néctar. La cantidad de polen se reduce rápidamente durante las primeras horas tras antesis, debido a la actividad de los polinizadores, llegando incluso a descender un 81% en sandía (Wolf et al., 1999; Stanghellini et al., 2002; Araújo et al., 2014). En ese sentido, se observó que *E. aeneus* no disminuye significativamente las veces que toma polen de las flores, pero sí del tiempo que dedica a esta recolección (Figura 10). Esto se explicaría porque su atracción hacia esa flor no disminuye, pero su tiempo es menor durante la tarde al encontrar menor cantidad de polen en las anteras (Figura 10). En el caso del néctar, los ritmos de secreción aumentan desde la mañana hasta alcanzar un máximo a medio día y tarde (ver capítulo 5). Por tanto, el aumento del número y duración de visitas se relacionaría con una mayor secreción de néctar en la tarde (Figura 9 y 10).

En la actualidad, el insecto más empleado en la polinización de sandía es la abeja melífera (Wijesinghe et al., 2020), debido a su facilidad de manejo y transporte (Wolf et al., 1999). Sin embargo, diferencias entre variedades en los atractivos florales, como tamaño y color de los pétalos, volumen y contenido de azúcares en néctar, es común y puede repercutir en el comportamiento del polinizador. Por ejemplo, la diferente concentración de azúcares entre cultivares de sandía determina la actividad de forrajeo de las abejas, siendo más visitadas las más atractivas a primera hora de la mañana (Wolf et al., 1995). De igual forma, en el cultivo del melón, el comportamiento de forrajeo y frecuencia de visitas de la abeja melífera están afectados por la variedad, el tipo de flor y la recompensa tomada (Kiill et al., 2014). Sin duda alguna, esta marcada preferencia floral por parte de los himenópteros afecta negativamente al cuajado de los frutos. En los sírfidos, no se ha observado ninguna preferencia floral (Cuadro 3 y 4). Sin embargo, sí se observa preferencia hacia el polen, con una mayor reincidencia en la búsqueda de este recurso durante su visita a la flor estaminada. Por tanto, presenta un comportamiento de forrajeo generalista entre variedades y entre tipos de flores permitiendo su recomendación como polinizador del cultivo de la sandía.

5. Bibliografía

Adlerz, W.C. 1966. Honeybee visit numbers and watermelon pollination1. *Journal of Economic Entomology* 59: 28-30.

Amano, K. 2004. Attempts to introduce stingless bees for the pollination of crops under greenhouse conditions in Japan. *Technical bulletin (Asian and Pacific Council. Food & Fertilizer Technology Center)* 167: 1-9.

- Araújo, D., Siqueira, K., Duarte, P., Silva, N. 2014. Comportamento de forrageamento de *Apis mellifera* na melancia (*Citrullus lanatus*) no município de Juazeiro, BA. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 9: 59-67.
- Azo'o, E.M., Bissou, W.B., Tchuengem, F.F.N. 2020. Comparing the foraging behaviour and pollination efficiency of *Apis mellifera* with *Xylocopa olivacea* (Apidae: Hymenoptera) on *Citrullus lanatus* flowers. *Journal of Applied Horticulture* 22: 18-23.
- Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., de Aragão, F.A.S., Freitas, B.M. 2014. Adaptive and foraging behavior of two stingless bee species in greenhouse mini watermelon pollination. *Sociobiology* 61: 502-509.
- Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., Freitas, B.M., Aragão, F.A.S. de. 2015. Pollination requirements of seeded and seedless mini watermelon varieties cultivated under protected environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50: 44-53.
- Campbell, J.W., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2018. Fruit set and single visit stigma pollen deposition by managed bumble bees and wild bees in *Citrullus lanatus* (Cucurbitales: Cucurbitaceae). *Journal of Economic Entomology* 111: 989-992.
- Campbell, J.W., Stanley-Stahr, C., Bammer, M., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2019. Contribution of bees and other pollinators to watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) pollination. *Journal of Apicultural Research* 58: 597-603.
- Comba, L. 1999. Patch use by bumblebees (Hymenoptera Apidae): temperature, wind, flower density and traplining. *Ethology Ecology & Evolution* 11: 243-264.
- Dafni, A., Kevan, P., Husband, B. 2005. *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Ontario, Canada.
- Dag, A. 2008. Bee pollination of crop plants under environmental conditions unique to enclosures. *Journal of Apicultural Research* 47: 162-165.
- Dag, A., Eisikowitch, D. 1995. The influence of hive location on honeybee foraging activity and fruit set in melons grown in plastic greenhouses. *Apidologie* 26: 511-519.
- Delaplane, K.S., Mayer, D.F. 2000. *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing Series, Wallingford, United Kingdom.
- Descamps, C., Jambrek, A., Quinet, M., Jacquemart, A.L. 2021. Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. *Insects* 12: 493.
- Emuh, F., Ojeifo, I. 2012. The phenology of flowering in *Citrullus lanatus* (Thumb.) Mansf. in southwestern Nigeria. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 5: 2031.
- Evans, L.J., Cutting, B.T., Jochym, M., Janke, M.A., Felman, C., Cross, S., Jacob, M., Goodwin, M. 2019. Netted crop covers reduce honeybee foraging activity and colony strength in a mass flowering crop. *Ecology and Evolution* 9: 5708-5719.
- FAOSTAT. 2021. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data> [Accedido 20 de agosto de 2021].
- Free, J.B. 1993. *Insect pollination of crops*. Academic Press, London.
- Garantonakis, N., Varikou, K., Birouraki, A., Edwards, M., Kalliakaki, V., Andrinopoulos, F. 2016. Comparing the pollination services of honeybees and wild bees in a watermelon field. *Scientia Horticulturae* 204: 138-144.
- Gilbert, F.S. 1985. Diurnal activity patterns in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Ecological Entomology* 10: 385-392.

- Heinrich, B. 1979. «Majoring» and «Minoring» by Foraging Bumblebees, *Bombus Vagans*: an experimental analysis. *Ecology* 60: 245-255.
- Herrera, C.M. 1990. Daily patterns of pollinator activity, differential pollinating effectiveness, and floral resource availability, in a summer flowering Mediterranean shrub. *Oikos* 58: 277-288.
- Inouye, D.W., Larson, B.M.H., Ssymank, A., Kevan, P.G. 2015. Flies and Flowers III: ecology of foraging and pollination. *Journal of Pollination Ecology* 16: 115-133.
- Kendall, L.K., Evans, L.J., Gee, M., Smith, T.J., Gagic, V., Lobaton, J.D., Hall, M.A. et al. 2021. The effect of protective covers on pollinator health and pollination service delivery. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 319: 107556.
- Kiill, L., Siqueira, K., Coelho, M., Silva, T., Gama, D., Araújo, D.C.S., Pereira, J. 2014. Frequency and foraging behavior of *Apis mellifera* in two melon hybrids in Juazeiro, state of Bahia, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 86: 2049-2055.
- Klein, A.-M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 303-313.
- Kwon, Y.J., Saeed, S. 2003. Effect of temperature on the foraging activity of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) on greenhouse hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Applied Entomology and Zoology* 38: 275-280.
- Mann, L.K. 1943. Fruit shape of watermelon as affected by placement of pollen on stigma. *Botanical Gazette* 105: 257-262.
- Marcos-García, M.A. 1985. Los Syrphidae (Diptera) de las sierras occidentales del Sistema Central español. Subfamilias: Eristalinae, Lampetiinae, Microdontinae, Milesiinae y Cerianinae. *Boletín Asociación española Entomología* IX: 187-210.
- Maynard, D.N. 1989. Triploid watermelons: a new version of an old crop. *American Vegetable Grower* 37: 42-43.
- McGregor, S.E. 1976. *Insect Pollination Of Cultivated Crop Plants*. United States Department of Agriculture.
- Ne'eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S.G., Dafni, A. 2010. A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85: 435-451.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.M. 2010. Diversity and efficiency of wild pollinators of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) at Yatta (Kenya). *Journal of Applied Horticulture* 12: 35-41.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.W. 2004. Pollination ecology of *Citrullus lanatus* at Yatta, Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science* 24: 73-77.
- Occhiuzzi, P. 1999. Stingless bees thrive in glasshouse trial. *Aussie Bee* 12: 8-11.
- Pérez-Bañón, M.C. 2000. *Biología de los sírfidos (Diptera: Syrphidae) de los ecosistemas insulares de la Comunidad valenciana: aspectos de la relación sírfido-planta*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, Alicante.
- Rader, R., Howlett, B.G., Cunningham, S.A., Westcott, D.A., Newstrom-Lloyd, L.E., Walker, M.K., Teulon, D.A.J., Edwards, W. 2009. Alternative pollinator taxa are equally efficient but not as effective as the honeybee in a mass flowering crop. *Journal of Applied Ecology* 46: 1080-1087.

- Sihag, R.C., Abrol, D.P. 1986. Correlation and path-coefficient analysis of environmental factors influencing flight activity of *Apis florea* F. *Journal of Apicultural Research* 25: 202-208.
- Speight, M.C.D. 2011. *Species accounts of European Syrphidae (Diptera)*. Syrph the Net publications, Glasgow.
- Ssymank, A. 1991. Die funktionale Bedeutung des Vegetationsmosaiks eines Waldgebietes der Schwarzwaldvorbergzone für blütenbesuchende Insekten: untersucht am Beispiel der Schwebfliegen (Diptera, Syrphidae). *Phytocoenologia* 307-390.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 2002. Diurnal activity, floral visitation and pollen deposition by honeybees and bumble bees on field-grown cucumber and watermelon. *Journal of Apicultural Research* 41: 27-34.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1997. The effects of honeybee and bumble bee pollination on fruit set and abortion of cucumber and watermelon. *American Bee Journal* 137: 386-391.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1998. Using commercial bumblebee colonies as backup pollinators for honeybees to produce cucumbers and watermelons. *HortTechnology* 8: 590-594.
- Szabo, T.I. 1980. Effect of weather factors on honeybee flight activity and colony weight gain. *Journal of Apicultural Research* 19: 164-171.
- Taha, E.-K., Bayoumi, Y. 2009. The value of honeybees (*Apis mellifera*, L.) as pollinators of summer seed watermelon (*Citrullus lanatus colothynthoides* L.) in Egypt. *Acta Biologica Szegediensis* 53: 33-37.
- Vaissière, B.E., Froissart, R. 1996. Pollination of cantaloupes under spun bonded row cover by honeybees (Hymenoptera: Apidae) in West Africa. *Journal of Economic Entomology* 89: 1213-1222.
- Vogt, F.D. 1986. Thermoregulation in bumblebee colonies. I. Thermoregulatory versus brood-maintenance behaviors during acute changes in ambient temperature. *Physiological Zoology* 59: 55-59.
- Walters, S.A. 2005. Influence of honeybee pollination on triploid watermelon fruit set and quality. *HortScience* 40: 1118C - 1118.
- Wijesinghe, S.A.E.C., Evans, L.J., Kirkland, L., Rader, R. 2020. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Scientia Horticulturae* 271: 109493.
- Willmer, P.G. 1983. Thermal constraints on activity patterns in nectar-feeding insects. *Ecological Entomology* 8: 455-469.
- Winfrey, R., Williams, N.M., Dushoff, J., Kremen, C. 2007. Native bees provide insurance against ongoing honeybee losses. *Ecology Letters* 10: 1105-1113.
- Wolf, S., Lensky, Y., Paldi, N. 1999. Genetic variability in flower attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.) within the genus *Citrullus*. *HortScience* 34: 860-863.

CAPÍTULO VII: EFICACIA
POLINIZADORA DEL SÍRFIDO
***ERISTALINUS AENEUS* BAJO TRES**
DENSIDADES DE SUELTA EN EL
CULTIVO ASOCIADO DE SANDÍA
DIPLOIDE Y TRIPLOIDE



1. Introducción

La sandía (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) es un cultivo herbáceo rastrero monoico, con flores estaminadas y pistiladas separadas dentro de la misma planta, perteneciente al grupo de las cucurbitáceas (Familia *Cucurbitaceae*). Dentro de esta familia, que incluye más de 800 especies, se encuentran los pepinos, melones, calabacines, calabazas y otras especies cultivadas de los géneros *Cucumis*, *Cucurbita* y *Citrullus*. Las flores de la sandía son pequeñas, de unos 3 cm de diámetro, amarillas y actinomorfas, apareciendo, por lo general, una sola flor por nudo, y siendo en su mayoría estaminadas frente a pistiladas (con una ratio de 8:1 aproximadamente). Los frutos de la sandía presentan variación de tamaño (de 1 a 20 kg), forma (de esférica a ovalada), color de corteza (casi siempre verde en un tono, o dos tonos a modo de rayas) y color de la placenta (verde claro, blanco, amarillo, naranja, rosa o rojo) (Schaffer y Paris, 2016).

Según la FAO, la sandía se encuentra entre los 10 cultivos hortícolas de mayor importancia económica, siendo la cucurbitácea con mayor producción a nivel mundial. China es el principal país productor, seguido de Turquía, Irán, Estados Unidos, Egipto, México, Kazajistán, España y Arabia Saudí (Schaffer y Paris, 2016; FAOSTAT, 2021). Esta especie es originaria del África tropical y está bien adaptada a climas cálidos y secos, requiriendo para su cultivo un periodo de crecimiento largo (Schaffer y Paris, 2016). Por ello, su cultivo en invernadero favorece su producción en primavera, adelantando así su comercialización en los mercados internacionales. En España, el cultivo protegido de sandía ha experimentado un gran incremento, aumentando su superficie en un 36% en los últimos 10 años. La producción de sandía bajo invernadero permite precocidad en la cosecha y aumento del rendimiento y calidad de los frutos, debido al control de las condiciones ambientales y de las plagas y enfermedades.

La sandía incluye variedades diploides (frutos con semilla) y triploides (frutos sin semilla, debido a aborto de la semilla), siendo estas segundas las variedades más cotizadas (Wijesinghe et al., 2020). Además, se han desarrollado otras variedades de gran interés económico, como la sandía mini, de consumo individual. A pesar de la ausencia de semillas en las variedades triploides, estos cultivares requieren igualmente de polinización. Debido a que las flores estaminadas de las variedades triploides carecen de polen viable (Castro-López et al., 2013), éste debe ser transportado a las flores pistiladas (de ambos tipos) desde las flores estaminadas de cultivares diploides. Se trata pues, de

plantas obligadamente xenógamas en el caso de las variedades triploides, y geitonogamas, las diploides. La fructificación de la sandía depende completamente de la polinización entomófila (Free, 1993; Delaplane y Mayer, 2000). Una óptima polinización en sandía requiere entre 500 y 1.000 granos de polen depositados en el estigma de cada flor pistilada (Adlerz, 1966; Maynard, 1989; Free, 1993).

A pesar de que la polinización en cultivos comerciales de sandía se desarrolla principalmente mediante abejas melíferas, se pueden dar déficits de polinización como consecuencia de un inadecuado servicio de polinización por parte de estos himenópteros (Sawe et al., 2020). Por otro lado, la producción bajo invernadero dificulta la labor de forrajeo de las abejas y, además, el acceso de polinizadores silvestres. El comportamiento inadecuado de los himenópteros se debe a causas como condiciones ambientales extremas, falta de alimento, uso de productos fitosanitarios y el estrés que les supone forrajear en recintos cerrados (Dag y Eisikowitch, 1995; Westphal et al., 2003; Dag, 2008; Rollin et al., 2013; Evans et al., 2019; Descamps et al., 2021; Kendall et al., 2021). Otro factor limitante para las abejas en el cultivo protegido responde a la influencia negativa de las cubiertas plásticas foto-selectivas sobre su visión, que les dificulta identificar las flores y orientarse de manera correcta (Petropoulou et al., 2001; Spaethe y Briscoe, 2005; Blacquièrre et al., 2006). Hasta el momento, en sandía solo se han llevado a cabo planes de polinización basados en himenópteros como la abeja melífera y el abejorro, y ocasionalmente otras abejas silvestres (Stanghellini et al., 1998; Njoroge, Gemmill-Herren, et al., 2010; Bomfim et al., 2014; Marchese et al., 2015; Garantonakis et al., 2016; Pisanty et al., 2016; Campbell et al., 2018, 2019; Azo'o et al., 2020). Ante los problemas citados anteriormente, diversos trabajos sugieren el uso de atrayentes para mejorar el rendimiento y capacidad de forrajeo de las abejas melíferas (Guerra-Sanz y Roldán-Serrano, 2008), y, cuando no, el uso de reguladores hormonales (Huitrón et al., 2007).

A pesar de que la abeja melífera destaca como el principal polinizador de cultivos a nivel mundial, otras muchas especies contribuyen a la polinización de los cultivos (Kremen et al., 2002; Njoroge et al., 2004; Taha y Bayoumi, 2009; Njoroge, Gemmill, et al., 2010; Garantonakis et al., 2016; Campbell et al., 2019; Rader et al., 2020). En sandía, los dípteros han sido rara vez considerados como potenciales polinizadores, siendo tan solo nombrados como visitantes ocasionales de sus flores (Njoroge et al., 2004; Taha y Bayoumi, 2009; Njoroge, Gemmill, et al., 2010; Layek et al., 2021). Sin embargo,

las características florales de este cultivo y su sistema de polinización sugieren el uso de estos insectos como polinizadores.

El objetivo de este capítulo es determinar la eficacia polinizadora de *Eristalinus aeneus* experimentando tres densidades de suelta del sírfido en un cultivo protegido de sandía triploide, comparando la producción y la calidad de sus frutos. Además, se estudiará su actividad y eficacia polinizadora a través del número de visitas florales, el transporte de polen y la adhesión del polen en el estigma de las flores. El análisis permitirá determinar la densidad óptima de suelta de este sírfido como una herramienta para la polinización del cultivo protegido de sandía.

2. Materiales y Métodos

2.1. Ubicación del ensayo y material biológico

El ensayo se llevó a cabo en la finca experimental UAL-Anecoop, nave U19, ubicada en el término municipal de Retamar, Almería (España) (36° 51'55" N, 2° 17'01" W) (Figura 1). El invernadero cuenta con una superficie total de 1.024 m², con estructura tipo parral y cubierta de polietileno tricapa, con ventilación pasiva lateral y occidental con malla anti-insectos. El invernadero estaba compuesto por 8 capillas orientadas E-O, con dimensiones de 32 m de anchura y 32 m de largo, y una altura en canaleta de 3 m y de 4 m de altura en cumbre.



Figura 1. Ubicación de Finca Experimental UAL-Anecoop y recinto U19 (marcado en azul) en el que se desarrollaron los ensayos.

La plantación de sandía se realizó con las variedades comerciales Premium (cultivar diploide, tipo mini) y Fashion (cultivar triploide, tipo sin semillas), con una ratio

de plantación 1:3, y una densidad de 0.25 plantas/m² (Figura 2). El manejo del cultivo se hizo acorde a las recomendaciones técnicas de la Fundación UAL-Anecoop.



Figura 2. Distribución de la plantación en el invernadero. Las tablillas amarillas indican la ubicación de los cultivares diploides.

El ensayo se desarrolló con un diseño experimental de bloques al azar con 3 tratamientos y 4 repeticiones (Figura 3). Para su realización, se construyeron un total de 12 cerramientos de malla blanca de 6 x 6 hilos/cm², con una superficie de 32 m², cada una con 6 plantas triploides y 2 diploides en su interior. Los tratamientos fueron alta densidad (AD) con 45 individuos/m², media densidad (MD) con 30 individuos/m² y baja densidad (BD) con 15 individuos/m².

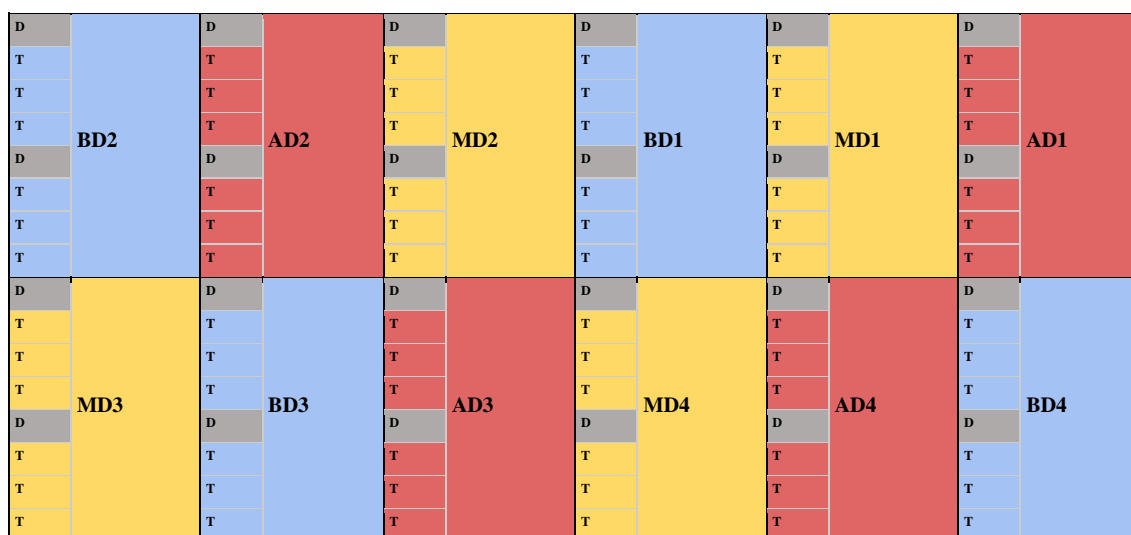


Figura 3. Distribución al azar de los bloques y distribución de las plantas de las variedades diploides (D) y triploides (T) en el interior de los cerramientos

En el interior de cada cerramiento se realizó una única suelta de pupas del sírfido *Eristalinus aeneus*, del proveedor Polyfly, en cada tratamiento y repetición: 1.440 pupas por cerramiento en AD, 960 pupas por cerramiento en MD, y 480 pupas por cerramiento en BD (Figura 4). La emergencia final de pupas fue comprobada tras finalizar los ensayos, obteniéndose valores entre el 93 y 98% (sin diferencias entre tratamientos), alcanzándose de este modo la densidad buscada.

Los ensayos se desarrollaron durante dos años consecutivos, 2020 y 2021, en los mismos cerramientos. La introducción de los sírfidos polinizadores se realizó con la aparición de las primeras flores pistiladas, y tras el despunte de los tallos, correspondiendo aproximadamente a 40 días después del trasplante. Las sueltas se realizaron el 4 de mayo de 2020 y el 19 de abril de 2021. En cada cerramiento se colocaron bebederos y placas con azúcar para evitar la mortalidad prematura de los sírfidos por falta de alimento.



Figura 4. Cerramiento de plantas de sandía en los que se realizaron los ensayos. Apréciase la introducción de los insectos polinizadores en cajas de suelta.

La temperatura durante la floración se registró ambos años mediante la colocación de un datalogger (ORIA WA64). Durante 2020, la temperatura promedio fue $25,25 \pm 8,36$ °C, la máxima $45,79$ °C y la mínima $8,36$ °C. Durante 2021, se registraron temperaturas inferiores, con una media de $23,31 \pm 8,09$ °C, una máxima de $43,00$ °C y una mínima de $8,09$ °C (Figura 5).

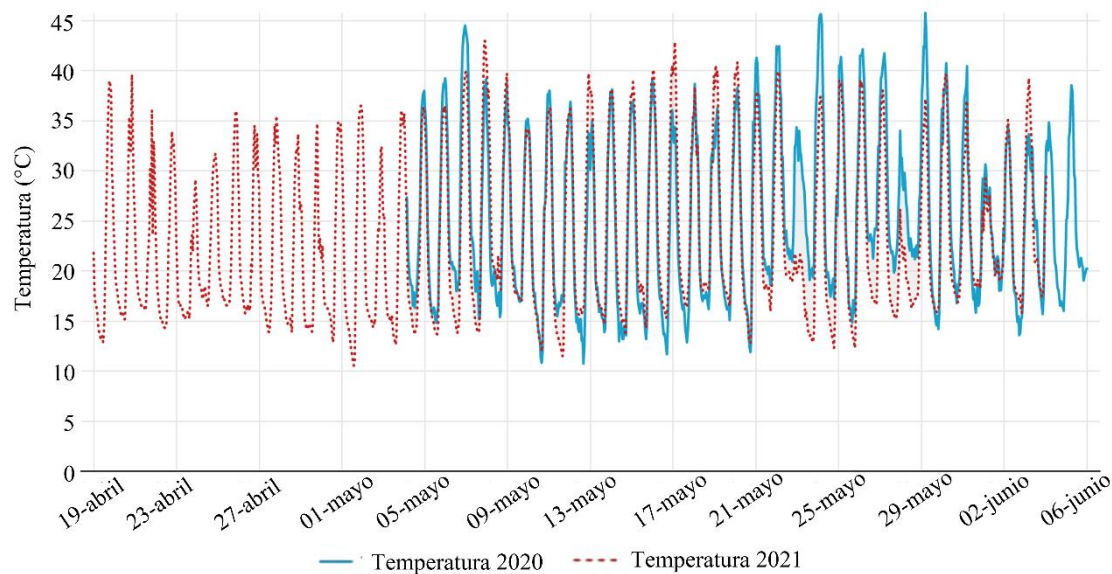


Figura 5. Evolución de las temperaturas registradas en los cerramientos en ambos años de estudio.

2.2. Parámetros evaluados

Visitas florales

Durante el primer año y con el objetivo de estudiar los cambios en el comportamiento de los insectos en función de la densidad de suelta, se estudió el número de visitas florales y la duración de las mismas. Para ello, se observaron dos flores pistiladas y dos estaminadas en cada cerramiento, durante 3 días no consecutivos a lo largo de la floración, con un total de 144 flores observadas (72 flores pistiladas y 72 estaminadas). Las flores, seleccionadas al azar en el momento de la observación, mostraban las características típicas de cultivares triploides, con mayor tamaño de pétalos y ovario en las flores pistiladas. La observación fue realizada entre las 10:00 y las 12:00, con un tiempo de 3 minutos por flor, en los que se anotaron el número y duración de las visitas. La visita fue considerada legítima únicamente cuando los sírfidos entraron en contacto con las partes reproductivas de la flor durante un tiempo superior a 2 segundos.

Interacción polen-pistilo

Se evaluó la interacción polen-pistilo en el cultivar triploide durante los dos años de ensayo. Para ello, se recolectaron el estilo y el estigma de 3 flores en cada tratamiento y repetición, en tres días no consecutivos a lo largo de la floración, con un total de 216 flores, 108 por año. Las flores fueron marcadas al azar y recolectadas transcurridas 48 horas tras su antesis. Estas flores se conservaron en FAE (formalina, ácido acético glacial

y etanol al 70 %, en una proporción 1:2:17 v/v) para su análisis bajo microscopía de epifluorescencia (Nikon E600) tras tinción con azul de anilina (Martin, 1959), determinándose la adhesión del polen en el estigma (Figura 6).

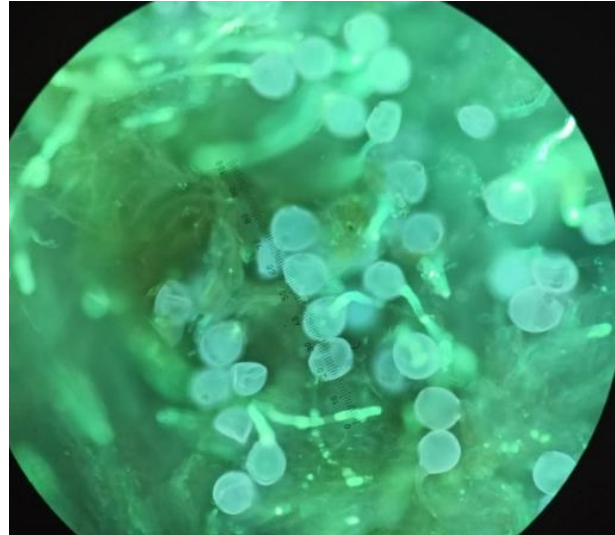


Figura 6. Adhesión de granos de polen en el estigma de sandía.

La adhesión de polen al estigma, en los tres lóbulos de la flor, fue estimado mediante el conteo de los granos de polen en tres áreas de cada lóbulo, y posteriormente calculado considerando el tamaño medio del estigma, establecido en 25,80 mm² cada lóbulo (Figura 7). También se determinó el porcentaje de flores con polen adherido.

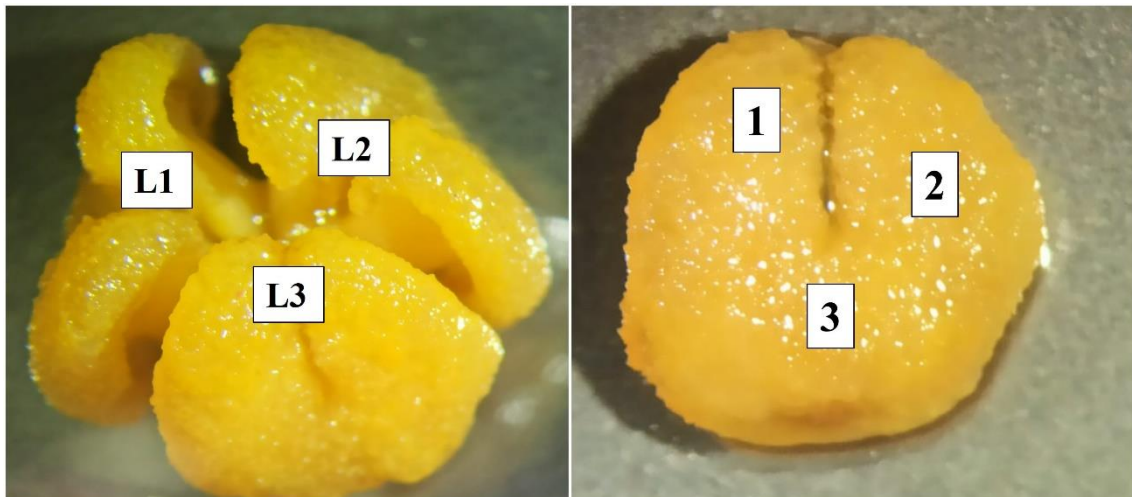


Figura 7. Lóbulos estigmáticos (tres) de la flor (izquierda) y puntos de muestreo en cada lóbulo de las flores (derecha) de sandía.

Cuajado del fruto, cosecha y componentes

La eficacia polinizadora del sírfido *E. aeneus* fue evaluada comparando los efectos de tres densidades de suelta sobre el cuajado de frutos y su precocidad (con conteos periódicos de los frutos cuajados), y sobre la producción final en ambos cultivares, diploides y triploides (Figura 8).



Figura 8. Cuajado de frutos de sandía en los cerramientos del ensayo.

También se determinó el número de semillas por fruto y su relación con su tamaño en 5 sandías diploides y 5 triploides por tratamiento y repetición, mediante el conteo de las mismas en $\frac{1}{4}$ del fruto. Las semillas del cultivar diploide son fácilmente reconocibles, ya que se desarrollan por completo y presentan colores oscuros. En el cultivar triploide, las semillas, blancas y tiernas, hizo más difícil el conteo (Figura 9).

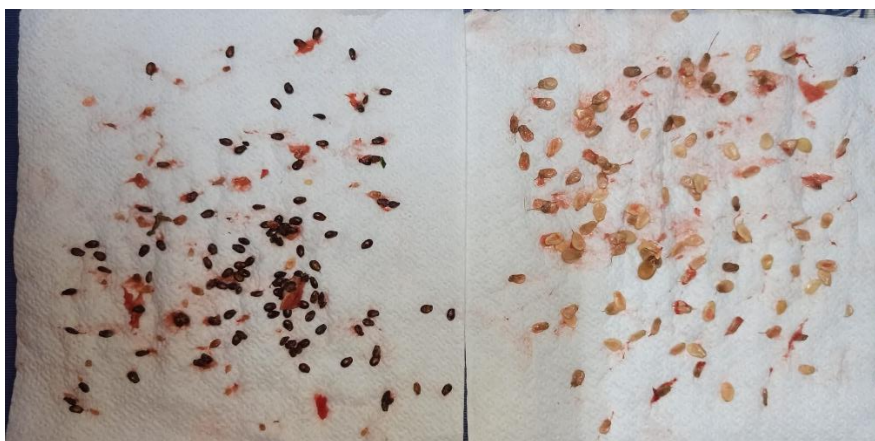


Figura 9. Extracción de semillas de sandía diploide (izquierda) y triploide (derecha).

También se caracterizó la cosecha, mediante el peso y categorización de los frutos. La categorización de los frutos se hizo en función al Reglamento (CE) N° 1862/2004 de la Comisión de 26 de octubre de 2004 por el que se establece la norma de

comercialización de las sandías en la Unión Europea. En las sandías triploides se clasificaron como primera categoría a los frutos no deformes, con color uniforme y peso superior a 2 kg. La segunda categoría contempló frutos ligeramente deformes o con pesos inferiores a 2 kg. Por último, los frutos no incluidos en las otras dos categorías se clasificaron como destrío, correspondiendo a frutos rajados o excesivamente deformes y con peso que no superaba el mínimo de 1 kg. En el caso de los frutos diploides, al tratarse de variedades “mini”, el peso mínimo establecido para la clasificación primera fue de 1,5 kg, y de 1 kg para la segunda categoría, con categoría destrío para el resto de frutos. Respecto a la calidad del fruto, se determinó el contenido en sólidos solubles, que debía ser superior a 8° por este mismo reglamento, en 5 frutos de plantas diploides y 5 triploides por tratamiento y repetición, en ambos años del ensayo. Para ello, se empleó un refractómetro digital ATAGO PR-101 α , tomándose un valor medio de tres registros correspondientes a la pulpa de cada fruto procesado.

2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el software R Statistical (R-Core Team, versión 4.1.3, Vienna, Austria). Para el análisis de la actividad del insecto, representada por el número y duración de las visitas florales, se llevaron a cabo Modelos Lineales Generalizados (GLM) con una previa transformación de raíz cuadrada a la variable dependiente (número de visitas a la flor y duración de las visitas) para asegurar una distribución normal de la variable respuesta. El número de visitas registradas en ambos tipos de flores se comparó mediante prueba t de Welch, para determinar la existencia de diferencias significativas en el número de visitas recibidas en cada tipo de flor, para cada una de las tres densidades de suelta. Los modelos finales fueron seleccionados comparando el valor AICc (Akaike Information Criterion) frente al valor de los modelos completos. Posteriormente, se realizó separación de medias mediante Test de Tukey ($p < 0.05$).

El análisis de la adhesión de polen para cada año se realizó mediante una ANOVA multifactorial, con la variable dependiente del número de granos de polen adheridos en el estigma y el factor independiente de densidad de suelta. Para determinar las diferencias en el número de granos de polen adheridos en los diferentes lóbulos de cada flor, se desarrolló un GLM con el número de granos de polen como variable dependiente y el tratamiento y número de lóbulos como variable independiente. El porcentaje de flores con más de 500 granos de polen adheridos se comparó mediante ANOVA, previa

transformación angular. Posteriormente, se realizó separación de medias mediante Test de Tukey ($p < 0.05$).

La producción de frutos, el peso de los frutos y el rendimiento, se analizó cada año mediante análisis de la varianza (ANOVA), comparando los diferentes tratamientos. Además, se comparó la calidad de los frutos mediante su categorización comercial según su peso y simetría. Cuando se detectaron diferencias significativas, se realizó la separación de medias con el Test de Tukey ($p < 0.05$). Por último, se analizó el rendimiento económico teórico (€/ha), a través del precio de venta en junio de 2020 y 2021, en función de la producción obtenida en cada categoría (Cuadro 1) (Junta de Andalucía, 2021).

Cuadro 1. Precio (€/kg) del cultivar diploide y triploide de sandía, según categoría del fruto, para los meses de junio de 2020 y 2021.

Variedad	Categoría	Año 2020	Año 2021
Diploide	Categoría I	0,19	0,17
	Categoría II	0,08	0,14
Triploide	Categoría I	0,31	0,25
	Categoría II	0,07	0,07

3. Resultados

Visitas florales

Durante el ensayo de 2020, se observaron 144 flores de sandía triploide en las que se registró un total de 451 visitas: 213 en flores pistiladas, y 238 en flores estaminadas. Se observó, por tanto, que este polinizador visitaba ambos tipos de flores en número similar (Figura 10). El número de visitas dependió de la densidad de suelta y del tipo de flor (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados del Modelo lineal generalizado (Análisis de la devianza, tipo III) para el número de visitas registrado en las flores de sandía. Las variables independientes incluidas fueron densidad de suelta y tipo de flor (estaminada y pistilada).

	S.C.	G.L.	F-valor	Pr (>F)
Densidad suelta	13,992	2	108,361	< 0,0001 ***
Tipo de flor	0,321	1	4,971	0,0274 *
Residuos	9,039	140		



Figura 10. Visitas a flores pistiladas (inferior) y estaminadas (superior) de sandía por E. aeneus.

El número de visitas florales efectuadas por los sírfidos fue significativamente mayor conforme se aumentó su densidad de suelta, tanto en flores pistiladas ($p < 0,0001$), como en estaminadas ($p < 0,0001$). En la flor pistilada, se registró un mínimo de 1 visita, sucedida en BD, y un máximo de 5 visitas, observadas tanto en AD como en MD. Para la flor estaminada, se registró un mínimo de 1 visita, en BD, y un máximo de 8 visitas en AD (Cuadro 3). Hubo diferencias significativas en las visitas a flores pistiladas versus estaminadas en cada densidad de suelta. En el tratamiento de AD, el número de visitas a flores estaminadas fue significativamente mayor que a las flores pistiladas ($t = -2,28$; $df = 41,41$; $p = 0,0281$). Sin embargo, estas diferencias significativas no aparecieron en MD ($t = -0,17$; $df = 45,88$; $p = 0,8654$) ni en BD ($t = -1,42$; $df = 44,56$; $p = 0,1641$).

Cuadro 3. Número medio de visitas (Media \pm SE), mínimo y máximas (entre paréntesis), realizadas por los sírfidos en los diferentes tipos de flores, en cada densidad de suelta, durante 3 minutos de observación.

	Flor pistilada	Flor estaminada
Alta densidad	3,92 \pm 0,18 a (3 – 5)	4,63 \pm 0,25 a (2 – 8)
Media densidad	3,33 \pm 0,18 b (2 – 5)	3,38 \pm 0,17 b (2 – 6)
Baja densidad	1,63 \pm 0,13 c (1 – 3)	1,92 \pm 0,16 c (1 – 3)

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

La duración de las visitas en ninguno de los dos tipos de flores no estuvo, sin embargo, determinada por la densidad de suelta de los sírfidos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados del Modelo lineal generalizado (Análisis de la devianza, tipo III) para la duración de las visitas florales en sandía. Las variables independientes incluidas fueron densidad de suelta y tipo de flor.

	S.C.	G.L.	F-valor	Pr (>F)
Densidad suelta	3,41	2	0,346	0,7079
Tipo de flor	3,84	1	0,779	0,3778
Residuos	2222,22	451		

Así, la duración promedio de las visitas florales fue similar en ambas flores y en todas las densidades de suelta. La duración mínima de las visitas fue de 5 segundos, mientras que la máxima registrada superó al tiempo de observación de 180 segundos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Duración en segundos (*Media ± SE*), y valores mínimos y máximos entre paréntesis de las visitas florales realizadas por los sírfidos en los diferentes tipos de flores, en cada densidad de suelta.

	Flor estaminada	Flor pistilada
Alta densidad	42,63 ± 3,24 (8 – 180)	40,51 ± 2,54 (5 – 136)
Media densidad	42,08 ± 4,04 (6 – 175)	49,74 ± 4,29 (7 – 172)
Baja densidad	40,67 ± 4,76 (7 – 161)	45,28 ± 4,84 (8 – 179)

Interacción polen-pistilo

En todas las flores muestreadas se encontró adhesión de polen, independientemente del día de muestreo y del tratamiento, a excepción de BD durante 2021, cuando se halló una única flor sin ningún grano de polen depositado. También se observó la presencia de un gradiente geográfico en la deposición del polen dentro de los lóbulos del estigma, siendo muy superior en las zonas más externas que en las zonas más bajas cercanas al ovario, de más difícil acceso para el polinizador (Cuadro 6, Figura 11).

Cuadro 6. Anova multifactorial (*Análisis de la varianza tipo III*) de la adhesión de polen observado en las flores de sandía en las diferentes zonas del lóbulo de la flor y densidades de suelta.

	S.C.	G.L.	F	P-valor
Zona lóbulo	4.359,8	2	7,774	0,0010 ***
Densidad de suelta	2.604,2	2	4,643	0,0131 *
Densidad x Zona	458,3	4	0,409	0,8018
Residuos (corregido)	17.666,4	63		

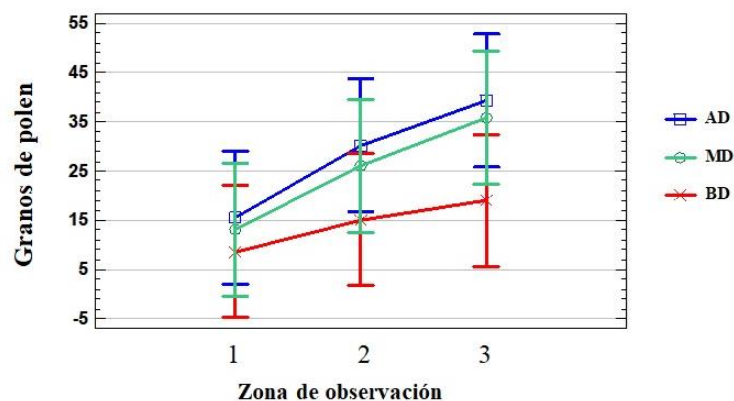


Figura 11. Número de granos de polen contabilizados en un área de $220 \mu\text{m}^2$ en tres zonas de la flor, para las tres densidades de suelta.

El mayor número de polen encontrado correspondió a las zonas más externas del estigma ($F_{(2, 69)} = 162,52$; $p < 0,0001$). Para AD, las zonas más externas contenían entre el 35 y el 53% del polen, seguido de las zonas intermedias, con entre el 31 y el 45% del polen, mientras que la zona más interna apenas tenía entre el 15 y el 26% del polen adherido. En el caso de MD, las zonas externas del lóbulo presentaban entre el 35 y el 54% del polen, frente a las zonas medias y más internas, que presentaban entre el 29 y el 41% y entre el 12 y el 25% del polen adherido total, respectivamente. Por último, las flores del tratamiento de BD presentaban en las zonas más externas del lóbulo un rango del 36-49%, seguido de las zonas medias, con un 27-38% y las zonas más internas del lóbulo, que presentaban un 15-33% del polen adherido.

Respecto al patrón de distribución de polen dentro de una misma flor, en 2020, no se encontraron diferencias significativas entre los tres lóbulos de una misma flor en la cantidad de polen ($F_{(2,210)} = 0,044$; $p = 0,9570$) ni 2021 ($F_{(4,315)} = 0,420$; $p = 0,7951$). Durante 2020, se detectó una media de $301,57 \pm 133,513$ granos de polen por lóbulo para AD, $270,63 \pm 137,86$ en MD, y $146,46 \pm 119,05$ en BD. En 2021, la media registrada fue de $238,99 \pm 131,78$ granos de polen por lóbulo para AD, $185,19 \pm 119,85$ en MD, y $116,10 \pm 132,32$ en BD. Es decir, tanto la densidad de suelta como el año del ensayo tuvieron efectos significativos sobre el número total de granos de polen adheridos en el estigma de la flor de sandía (Cuadro 7), pero no sobre su distribución dentro de la flor.

Cuadro 7. Anova (Análisis de la varianza tipo III) de la adhesión de polen en las flores de sandía en los diferentes tratamientos y años del ensayo

	S.C.	G.L.	F	P-valor
Densidad de suelta	730862	2	20,17	< 0,0001 ***
Año del ensayo	190930	1	10,54	0,0045 **
Densidad x Año	27570	2	0,76	0,4818
Residuos (corregido)	326195	18		

En promedio, el mayor número de granos de polen adheridos se observó en el tratamiento AD ambos años del ensayo, seguido de MD y de BD. Los máximos valores de polen adherido se registraron en AD ambos años, siendo superior a 1.800 granos por flor. En promedio, tanto AD como MD presentaron valores óptimos de adhesión de polen, superando el umbral de 500 granos por flor (Cuadro 8).

Cuadro 8. Adhesión de polen (Media \pm SE), valores mínimos y máximos entre paréntesis, en el estigma de la flor de sandía triploide para cada tratamiento de suelta, en ambos años del ensayo.

	2020	2021
Alta densidad	904,71 \pm 109,1 a (290 – 1.819)	716,95 \pm 24,32 a (233 – 1.804)
Media densidad	811,88 \pm 57,05 a (36 – 1.763)	555,56 \pm 34,25 a (9 – 1.167)
Baja densidad	439,38 \pm 64,16 b (36 – 1.101)	348,3 \pm 78,39 b (0 – 1.278)

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

En 2020, el porcentaje de flores con valores entre 500 y 1.000 granos de polen adheridos en el estigma fue del 45,4%, mientras que un 23,2% tenían más de 1.000 granos adheridos. En 2021, el porcentaje de flores con valores de entre 500 y 1.000 granos de polen adheridos al estigma bajó a un 34,3% y sólo un 14,8% tuvo más de 1.000 granos de polen adheridos. La densidad de suelta tuvo un efecto positivo en el porcentaje de flores con más de 500 granos de polen adheridos, tanto en 2020 ($F_{(2,9)} = 10,81$; $p = 0,0040$) como en 2021 ($F_{(2,9)} = 11,47$; $p = 0,0033$). En ambos años, el mayor porcentaje de flores que alcanzaron ese valor mínimo de polen adherido se obtuvo con el tratamiento AD, seguido de MD y de BD (Cuadro 9).

Cuadro 9. Flores (%) con más de 500 granos de polen adheridos en el estigma, para cada densidad de suelta. Años 2020 y 2021.

	2020	2021
Alta densidad	91,75 ± 8,25 a	69,75 ± 2,75 a
Media densidad	75,25 ± 9,39 a	49,75 ± 5,75 a
Baja densidad	38,75 ± 7,30 b	27,50 ± 7,10 b

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

Cuajado del fruto, cosecha y componentes

Los primeros frutos cuajados se observaron a la semana de la introducción de los sírfidos, unos 4 días después de su emergencia. Aunque durante los primeros días, se observó un buen cuajado en el tratamiento BD, lo cierto es que el mayor número de frutos se registró en los tratamientos de AD y MD, con diferencias notables con BD en 2021 (Figura 12).

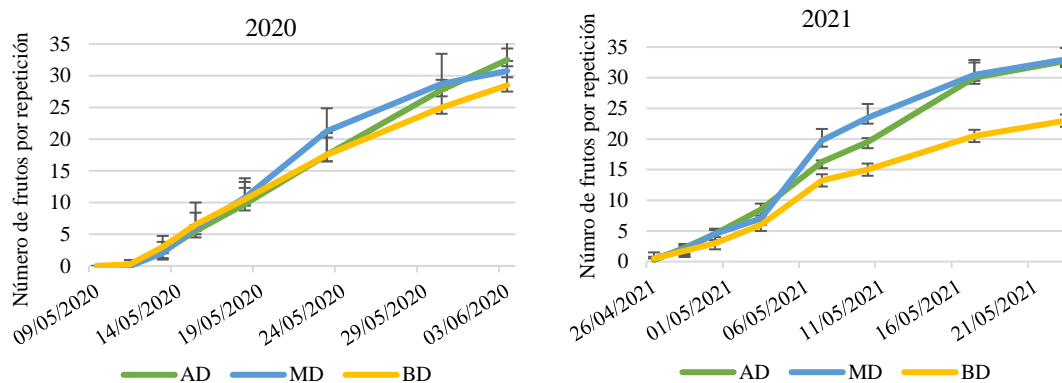


Figura 12. Producción acumulada (diploide y triploide conjunta) a lo largo del ciclo de sandía en el interior de los cerramientos. Años 2020 y 2021.

Durante 2020, el número de frutos triploides fue significativamente mayor en el tratamiento AD que en BD ($F_{(2,11)} = 6,17$; $p = 0,0206$), con el tratamiento MD en una posición intermedia. No hubo diferencias significativas en la producción de frutos diploides ($F_{(2,11)} = 0,64$; $p = 0,5483$). De igual modo, en 2021 hubo mayor número de frutos triploides en AD, seguido de MD y BD ($F_{(2,11)} = 7,40$; $p = 0,0126$) y ausencia de efectos en el caso de frutos diploides ($F_{(2,11)} = 1,91$; $p = 0,2041$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Frutos por planta recolectados en los cerramientos, para ambos cultivares de sandía. Años 2020 y 2021.

	2020		2021	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
AD	6,17 ± 0,33 a	4,89 ± 0,77 a	7,25 ± 0,83 a	3,71 ± 0,22 a
MD	5,38 ± 0,43 a	3,67 ± 0,31 ab	6,25 ± 0,59 a	3,54 ± 0,14 a
BD	6,50 ± 1,14 a	2,79 ± 0,36 b	5,00 ± 0,98 a	2,71 ± 0,22 b

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

La mayor densidad de suelta tuvo también efectos positivos sobre el peso del fruto, indicando de nuevo no sólo más flores cuajadas sino también mayor peso en respuesta a la mayor deposición de polen. En 2021 se observaron diferencias significativas en el peso de los frutos triploides en función de la densidad de suelta ($F_{(2,11)} = 5,35$; $p = 0,0295$), pero no en los frutos diploides ($F_{(2,11)} = 0,08$; $p = 0,9256$) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Peso (kg) de los frutos de sandía diploides y triploides (Media ± SE) en ambos años del ensayo para las tres densidades de suelta

	2020		2021	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Alta densidad	3,06 ± 0,38 a	5,24 ± 0,20 a	2,81 ± 0,21 a	5,50 ± 0,23 a
Media densidad	3,02 ± 0,09 a	5,02 ± 0,35 a	2,91 ± 0,10 a	4,89 ± 0,22 ab
Baja densidad	2,99 ± 0,21 a	5,00 ± 0,22 a	2,92 ± 0,29 a	4,18 ± 0,37 b

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

El rendimiento del cultivo mostró diferencias significativas según la densidad de suelta para el cultivar triploide, tanto en 2020 ($F_{(2,11)} = 4,47$; $p = 0,0449$) como en 2021 ($F_{(2,11)} = 24,92$; $p = 0,0002$), pero no en el cultivar diploide en 2020 ($F_{(2,11)} = 0,43$; $p = 0,6609$) ni 2021 ($F_{(2,11)} = 0,79$; $p = 0,4843$) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Rendimiento del cultivo (kg/m²) de sandía en los cerramientos, según cultivares en los diferentes tratamientos de polinización

	2020		2021	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Alta densidad	4,63 ± 0,49 a	5,93 ± 0,72 a	4,99 ± 0,35 a	5,07 ± 0,26 a
Media densidad	4,07 ± 0,37 a	4,67 ± 0,64 ab	4,51 ± 0,33 a	4,31 ± 0,05 a
Baja densidad	4,77 ± 0,76 a	3,45 ± 0,33 b	3,84 ± 1,03 a	2,82 ± 0,30 b

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

Respecto a la calidad, los frutos triploides fueron mayoritariamente de primera categoría en los dos años del ensayo. Durante 2020, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de frutos de Categoría I para las diferentes densidades de suelta ($F_{(2,11)} = 3,93$; $p = 0,0593$), pero sí más frutos en AD (91,1%), seguido de MD (84,7%), con BD como el menos interesante (82,7%). Estas diferencias, si alcanzaron significación estadística para Categoría II ($F_{(2,11)} = 22,68$; $p = 0,0003$), detectándose inversamente un mayor porcentaje de frutos de Categoría II en el tratamiento BD (15,7%) frente a AD (0,8%) y MD (1,1%). El porcentaje de frutos de destrío también estuvo significativamente relacionado con la densidad de suelta en 2020 ($F_{(2,11)} = 5,89$; $p = 0,0231$), siendo superior en MD (14,2%) y AD (8,1%) frente a BD (1,6%) (Figura 11A). Durante 2021 se observaron diferencias en el porcentaje de frutos de Categoría I ($F_{(2,11)} = 4,24$; $p = 0,0504$), a favor de AD (93,2%), seguido de MD (91,9%) y BD (82,1%). Los frutos de Categoría II no presentaron esta vez diferencias significativas ($F_{(2,11)} = 0,96$; $p = 0,4189$). Por último, el porcentaje de frutos de destrío también dependió de la densidad de suelta ($F_{(2,11)} = 7,57$; $p = 0,0118$), siendo superior en BD ese año (Figura 13A).

Durante 2020, no se observaron diferencias significativas en la variedad diploide entre las diferentes densidades de suelta para la Categoría I ($F_{(2,11)} = 0,10$; $p = 0,9076$), Categoría II ($F_{(2,11)} = 0,97$; $p = 0,4142$) y destrío ($F_{(2,11)} = 2,90$; $p = 0,1018$). Igual sucedió en 2021, cuando no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de frutos de Categoría I ($F_{(2,11)} = 0,25$; $p = 0,7844$), Categoría II ($F_{(2,11)} = 1,00$; $p = 0,4053$) y destrío ($F_{(2,11)} = 1,53$; $p = 0,2672$). En las tres densidades de suelta, el mayor porcentaje de frutos diploides correspondieron a la primera categoría tanto en 2020 (AD: 89,37%; MD: 88,31%; BD: 84,80%), como en 2021 (AD: 94,59%; MD: 98,33%; BD: 90,00%) (Figura 13B).

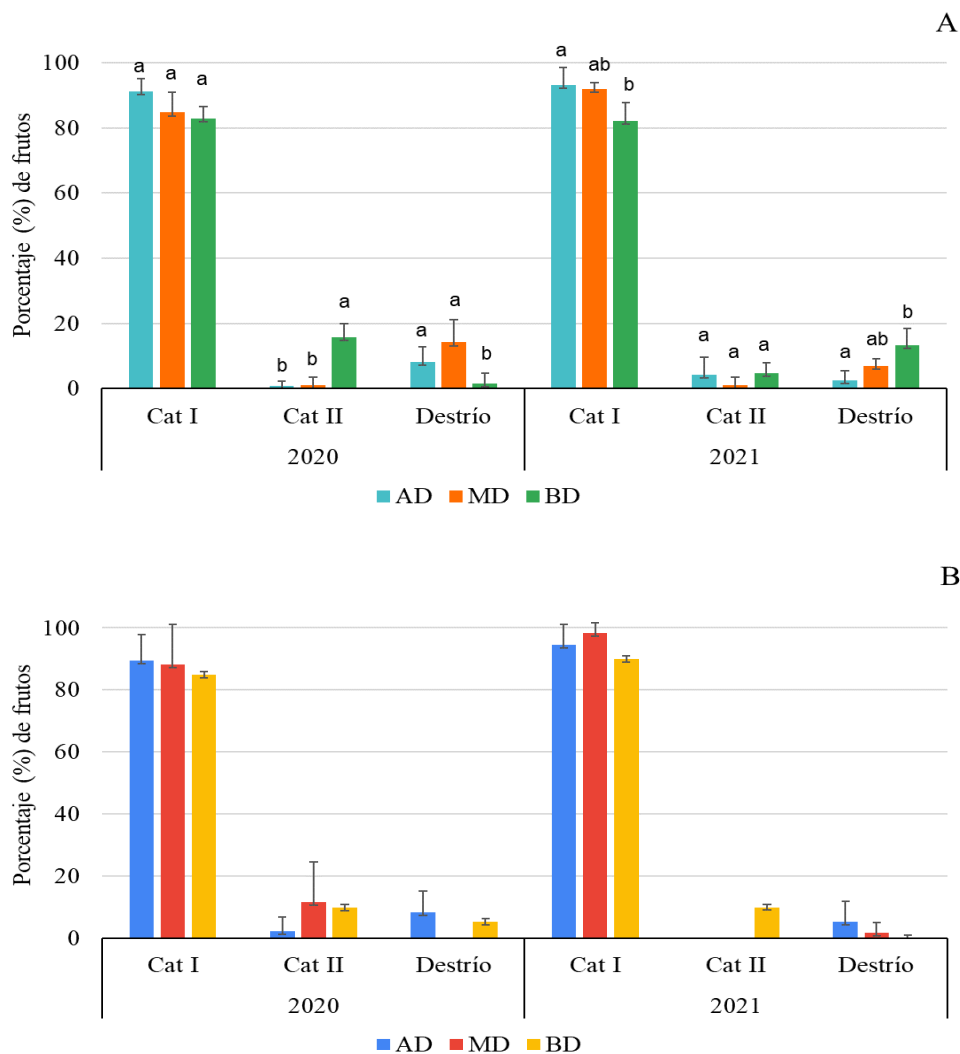


Figura 13. Porcentaje de frutos triploides (A) y diploides (B) según categorías de calidad y tratamientos de densidad de suelta. Diferentes letras en cada categoría para ambos cultivares indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p < 0,005$)

El rendimiento teórico estimado a partir de la recolección de frutos comerciales mostró un efecto positivo del incremento en la densidad de suelta del sírfido *E. aeneus* en términos de producción (t/ha) y rendimiento económico (€/ha). Durante ambos años, se obtuvo mayor rendimiento y rentabilidad en el cultivo de sandía triploide bajo AD de suelta de sírfidos, seguido de MD y BD (Cuadros 13 y 14).

Cuadro 13. Rendimiento teórico (t/ha) del cultivo de sandía considerando frutos comerciales para ambos cultivares. Años 2020 y 2021

	2020		2021	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Alta densidad	15,25	39,44	16,12	33,57
Media densidad	13,55	30,13	14,83	28,11
Baja densidad	15,65	22,96	12,79	17,91

Cuadro 14. Rendimiento económico teórico (€/ha) del cultivo para ambos años de ensayo

	2020			2021		
	Diploide	Triploide	Total 2020	Diploide	Triploide	Total 2021
Alta densidad	2.877,89	12.118,11	14.996,00	2.740,44	8.232,24	10.972,69
Media densidad	2.489,82	9.259,15	11.748,97	2.520,88	7.001,28	9.522,16
Baja densidad	2.880,50	6.604,32	9.484,82	2.163,24	4.356,88	6.520,13

El número de semillas fue determinado para ¼ del fruto, obteniéndose un valor de $334,50 \pm 39,28$ semillas para cultivares diploides y de $286,50 \pm 40,87$ semillas vanas para triploides en 2020. El número de semillas fue superior en 2021 con $392,50 \pm 63,45$ para los frutos diploides y $374,67 \pm 64,88$ semillas vanas en los frutos triploides. El número de semillas en los frutos diploides no estuvo influido por la densidad de suelta del polinizador en 2020 ($F_{(2,11)} = 1,71$; $p = 0,2343$) ni en 2021 ($F_{(2,11)} = 3,16$; $p = 0,0915$), aunque en ambos años, los valores fueron ligeramente superiores en AD, seguidos de MD y por último BD. Sin embargo, el número de semillas sí se incrementó con la densidad de suelta para el cultivar triploide tanto en 2020 ($F_{(2,11)} = 11,46$; $p = 0,0034$) como en 2021 ($F_{(2,11)} = 13,18$; $p = 0,0021$) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Número de semillas en 1/4 del fruto en los cultivares diploides y triploides de sandía para ambos años

	2020		2021	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Alta densidad	$346,75 \pm 18,25$ a	$311,75 \pm 13,94$ a	$424,50 \pm 29,24$ a	$434,50 \pm 19,21$ a
Media densidad	$342,00 \pm 12,89$ a	$304,75 \pm 9,68$ a	$403,00 \pm 19,00$ a	$400,50 \pm 23,29$ a
Baja densidad	$314,75 \pm 4,82$ a	$243,00 \pm 9,31$ b	$350,00 \pm 13,46$ a	$289,00 \pm 20,17$ b

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

Por último, la determinación del contenido en sólidos solubles (° Brix) en los frutos mostró que la densidad de suelta del polinizador no tuvo efectos significativos sobre este parámetro (Cuadro 16). Los valores de ° Brix en frutos diploides oscilaron entre 6,3 y 11,7 en 2020, y entre 9,7 y 14,4 ° Brix en 2021. En el caso de los frutos triploides, los valores oscilaron entre 9,2 y 14,0 durante 2020, y entre 10,2 y 16,0 ° Brix en 2021 (Cuadro 16).

Cuadro 16. Grados Brix ($^{\circ}$ Brix) de los frutos de sandía diploides y triploides en ambos años del ensayo

	2020		2021	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Alta densidad	9,17 \pm 0,32 a	11,09 \pm 0,17 a	11,62 \pm 0,34 a	13,08 \pm 0,40 a
Media densidad	9,45 \pm 0,36 a	11,49 \pm 0,28 a	11,90 \pm 0,19 a	12,75 \pm 0,21 a
Baja densidad	9,42 \pm 0,74 a	11,25 \pm 0,29 a	11,89 \pm 0,39 a	12,43 \pm 0,26 a

* En una misma columna, letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre densidades de suelta (Test de Tukey $p < 0.05$)

4. Discusión

La producción de sandía en este ensayo muestra la eficacia polinizadora del sírfido *E. aeneus*. En ambos años de estudio se alcanzó un óptimo rendimiento del cultivo con un alto número de frutos por planta con un elevado peso (Cuadros 10, 11 y 12). El bajo número de frutos de menor peso o deformes permitió, además, que la mayoría de los frutos fueran incluidos en Categoría I tanto en 2020 como en 2021 (Figura 12).

Los valores del rendimiento del cultivo de sandía en condiciones de invernadero están comprendidos entre 4 y 6 kg/m² (Reche, 1994). Más concretamente, los rendimientos medios en España durante 2020 fueron de 5,7 kg/m², según el Observatorio de precios de la Junta de Andalucía y ESCYRE. Lamentablemente, estos datos no especifican las variedades cultivadas, y en caso de contener cultivares diploides y triploides, en qué ratios se encontraban ambos, o incluso su densidad de plantación. Esta proporción entre plantas donantes y receptoras de polen varía según diversos factores, llegando a ser entre 1:7 y 1:17 en cultivos al aire libre (Wijesinghe et al., 2020). Al no producir las plantas triploides polen viable, una óptima polinización requiere un 20-33% de plantas diploides donantes de polen (Fiacchino y Walters, 2003; Freeman et al., 2007). Los sistemas de producción bajo invernadero de sandía se desarrollan normalmente con ratios de 1:2 o 1:3, lo que es lo mismo una planta diploide por cada dos o tres triploides. En este ensayo, con un 25% de plantas diploides (ratio 1:3), los rendimientos de ambos cultivares han alcanzado el valor medio para el cultivo de sandía en invernadero (Cuadro 12).

La eficacia de *E. aeneus* como polinizador estuvo directamente relacionada con su densidad de suelta, siendo mayores los rendimientos para el cultivar triploide (sandías apirenas) con densidades de 45 y 30 individuos/m² (Cuadro 12). Estas densidades de

suelta incrementaron el rendimiento teórico del cultivo triploide entre el 23,8 y 41,8% durante 2020, y entre el 36,3 y 46,7 % durante 2021 (Cuadro 13). Sin embargo, en el cultivar diploide (sandías con semillas), la densidad de suelta no influyó en el rendimiento del cultivo (Cuadro 12), obteniéndose valores óptimos también con una baja densidad de suelta (15 individuos/m²). Parece que, en el caso del cultivar diploide la proximidad de las flores donantes y receptoras del polen reduce el coste energético del vuelo de los polinizadores (Harder y Barrett, 1996), alcanzándose buenos niveles de polinización incluso con menor número de insectos polinizadores. Estos resultados positivos requieren confirmación a mayor escala.

Una óptima polinización en sandía influye tanto en la producción de frutos como en la calidad de los mismos (Guerra-Sanz y Roldán-Serrano, 2008). Entre los factores que afectan a la polinización en el cultivo de sandía se encuentran la hora de realización de las visitas florales (debido a la corta receptividad del estigma), el número de visitas que reciben las flores y la propia distribución de los granos de polen en el estigma de la flor. Algunos ensayos muestran mayor cuajado cuando la polinización se produce en la mañana (Wijesinghe et al., 2020). En este ensayo no se ha analizado la actividad de forrajeo de los sírfidos a lo largo del día, sin embargo, los resultados del Capítulo 6 confirman que la principal actividad de *E. aeneus* en el cultivo de sandía durante la mañana es el forrajeo.

Por otro lado, en este ensayo se observó que una mayor densidad de sírfidos no modificó la duración de las visitas florales ni a las flores estaminadas ni a las pistiladas, pero sí incrementó significativamente el número de visitas que recibieron ambos tipos de flores (Cuadro 3 y 5). La duración de las visitas está relacionada con la eficacia polinizadora, puesto que un mayor tiempo de visita y sus consecuentes movimientos dentro de la flor pistilada facilita una mayor y mejor distribución de los granos de polen en el estigma (Munyuli, 2014). Nuestros resultados muestran una duración media de 45 s por flor, no observándose diferencias según tipo de flor (Cuadro 5). Según Garantonakis et al. (2016), la duración de las visitas en sandía es de 57 s por flor para una abeja minera, y de 19 s para una abeja melífera. La duración de las visitas florales de abejas en el cultivo de sandía ha sido evaluada también en el Capítulo 8 de esta tesis, donde se determinaron duraciones de 6 s en flores estaminadas, y de 12 s en flores pistiladas de sandía, valores similares a los obtenidos por Araújo et al. (2014). Njoroge et al. (2004) determinaron

duraciones aún menores de la visita de abeja melífera a cultivares de sandía con semilla con valores de 1,49 s en flores pistiladas y de 0,56 s en flores estaminadas.

Cabe destacar que el número de visitas florales está directamente relacionado con el número de polinizadores disponibles en el cultivo y su comportamiento de forrajeo. En sandía, de manera general, se recomienda la colocación de un mínimo de dos o tres colmenas de abejas, o siete de abejorros, por hectárea para lograr una óptima polinización. En el caso de cultivares diploides y triploides en asociación, la población de abejas debería ser mayor cuanto menor sea la proporción del cultivar diploide (Adlerz, 1966; Reche, 1994). Es conocido que la sandía requiere múltiples visitas de los polinizadores para asegurar el cuajado del fruto. Trabajos previos con himenópteros sugieren un rango muy variable de visitas, entre 10 y 60, para asegurar el cuajado de la flor, y además obtener frutos con calidad comercial (Adlerz, 1966; Stanghellini et al., 1997; Walters, 2005; Winfree et al., 2007). En este ensayo, se registraron tasas de entre 33 y 78 visitas/h en las flores pistiladas, y de entre 38 y 93 visitas/h en las estaminadas, en función de la densidad de suelta del sírfido (Cuadro 3). Los himenópteros como abejas y abejorros depositan, según modelos predictivos, mayor cantidad de polen por visita (4.335 y 2.814, respectivamente), que otros insectos más pequeños (Winfree et al., 2007). Por tanto, será necesario un mayor número de visitas de *E. aeneus* para lograr una óptima polinización.

Por otra parte, *E. aeneus* no mostró preferencias respecto al sexo de la flor, a diferencia de la abeja melífera que registra mayor número de visitas a flores estaminadas (Njoroge et al., 2004). Tan sólo en AD se observó un número de visitas significativamente mayor a las flores estaminadas. Estos patrones de visitas son especialmente importantes en plantas que requieren visitas a flores de ambos sexos, y especialmente a flores estaminadas con polen viable. En este ensayo no se observó que *E. aeneus* mostrara una clara preferencia por flores estaminadas, como sucede con los polinizadores considerados legítimos en el cultivo de sandía (Layek et al., 2021).

Los datos de adhesión de polen en este ensayo (Cuadro 8) fueron inferiores a la estimación realizada para abejas melíferas y abejorros mediante modelos, pero fue superior a los estimados para abejas silvestres (Winfree et al., 2007; Campbell et al., 2019). Debido a que la fuente de polen viable en el interior de los cerramientos de este ensayo está limitada, el transporte de polen en mayores superficies de cultivo debe ser evaluado. La distribución homogénea de los granos de polen por los tres lóbulos del estigma de la flor pistilada es fundamental para el óptimo desarrollo de este fruto

multisemillado (Mann, 1943). En la adhesión de polen analizada en este ensayo, se observó una distribución homogénea de los granos de polen en los tres lóbulos estigmáticos de la flor, independientemente del número total de granos de polen depositados y de la densidad de suelta. También se observó que el mayor porcentaje de granos de polen se encontraban en las partes más externas del estigma de la flor, coincidiendo con zonas de mejor acceso para los polinizadores. En este cultivo, un mínimo de 500 – 1.000 granos de polen son necesarios para la obtención de un fruto en los cultivares diploides (Adlerz, 1966; Maynard, 1989; Free, 1993). En este ensayo, durante 2020, el 91,7 % de las flores alcanzaron este mínimo de 500 granos de polen en AD, un 75,0 % en MD y un 38,9 % en BD. En 2021, el porcentaje de flores con un mínimo de 500 granos de polen adheridos fue más bajo, con un 69,4% para AD, un 50,0% para MD y un 27,8% para BD. La diferencia entre años pudo deberse a la variación en la eficiencia de los polinizadores debida a factores climáticos, que ha sido observada por otros autores (Pinsaty et al., 2016). Sin embargo, en ambos años, la alta densidad de suelta permitió alcanzar una mayoría de flores con el mínimo de granos de polen requeridos. Esta mayor adhesión de granos de polen conllevó un mayor número de semillas por fruto (Cuadro 15). No se observó, por el contrario, mayor dulzor que algunos trabajos atribuyen a un mayor número de visitas (Cuadro 16) (Walters, 2005; Guerra-Sanz y Roldán-Serrano, 2008).

De acuerdo con Stebbins (1970) y Van der Niet et al., (2014), el “principio del polinizador más eficaz” establece que los rasgos florales son moldeados por aquellos polinizadores que visitan la flor con mayor frecuencia y eficacia. Se entiende por eficacia la probabilidad de que el polen se transfiera de las anteras al polinizador, probabilidad de que el polinizador visite otra flor de la misma especie antes de que el polen se pierda, y probabilidad de que el polen se transfiera del polinizador al estigma de la nueva flor. En este caso, *E. aeneus* ha recogido abundante polen viable de las anteras de las flores estaminadas, ha visitado frecuentemente las flores pistiladas, y ha depositado y distribuido regularmente el polen viable en el estigma de estas flores. Por tanto, en este ensayo se determina que *E. aeneus* es un eficaz polinizador para el cultivo protegido de sandía diploide y triploide. La densidad de suelta más efectiva para el cultivo de sandía protegida con cultivares asociados diploides y triploides estaría entre 30 y 45 individuos/m². En caso de que la variedad en producción sea diploide, la densidad de suelta puede descender hasta los 15-30 individuos/m².

5. Bibliografía

Adlerz, W.C. 1966. Honeybee visit numbers and watermelon pollination. *Journal of Economic Entomology* 59: 28-30.

Azo'o, E.M., Bissou, W.B., Tchuenguem, F.F.N. 2020. Comparing the foraging behaviour and pollination efficiency of *Apis mellifera* with *Xylocopa olivacea* (Apidae: Hymenoptera) on *Citrullus lanatus* flowers. *Journal of Applied Horticulture* 22: 18-23.

Blacquièrre, T., Aa-Furnée, J., Cornelissen, B., Donders, J. 2006. Behaviour of honeybees and bumble bees beneath three different greenhouse claddings. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 17: 93-102.

Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., de Aragão, F.A.S., Freitas, B.M. 2014. Adaptive and foraging behavior of two stingless bee species in greenhouse mini watermelon pollination. *Sociobiology* 61: 502-509.

Campbell, J.W., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2018. Fruit set and single visit stigma pollen deposition by managed bumble bees and wild bees in *Citrullus lanatus* (Cucurbitales: Cucurbitaceae). *Journal of Economic Entomology* 111: 989-992.

Campbell, J.W., Stanley-Stahr, C., Bammer, M., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2019. Contribution of bees and other pollinators to watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) pollination. *Journal of Apicultural Research* 58: 597-603.

Castro-López, A.J., García, E., Caballero, T.M., Linares, L., Piñar, A., Rivas, N., Santillán, N.V. et al. 2013. Seedless watermelons: from the microscope to the table through the greenhouse. *High School Students for Agricultural Science Research* 3: 27-32.

Dag, A. 2008. Bee pollination of crop plants under environmental conditions unique to enclosures. *Journal of Apicultural Research* 47: 162-165.

Dag, A., Eisikowitch, D. 1995. The influence of hive location on honeybee foraging activity and fruit set in melons grown in plastic greenhouses. *Apidologie* 26: 511-519.

Delaplane, K.S., Mayer, D.F. 2000. *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing Series, Wallingford, United Kingdom.

Descamps, C., Jambrek, A., Quinet, M., Jacquemart, A.-L. 2021. Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. *Insects* 12(6): 493.

Evans, L.J., Cutting, B.T., Jochym, M., Janke, M.A., Felman, C., Cross, S., Jacob, M., Goodwin, M. 2019. Netted crop covers reduce honeybee foraging activity and colony strength in a mass flowering crop. *Ecology and Evolution* 9: 5708-5719.

FAOSTAT. 2021. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data> [Accedido 20 de agosto de 2021].

Fiacchino, D.C., Walters, S.A. 2003. Influence of diploid pollinizer frequencies on triploid watermelon quality and yields. *HortTechnology* 13: 58-61.

Free, J.B. 1993. *Insect pollination of crops*. Academic Press, London.

Freeman, J.H., Miller, G.A., Olson, S.M., Stall, W.M. 2007. Diploid watermelon pollenizer cultivars differ with respect to triploid watermelon yield. *HortTechnology* 17: 518-522.

Garantonakis, N., Varikou, K., Birouraki, A., Edwards, M., Kalliakaki, V., Andrinopoulos, F. 2016. Comparing the pollination services of honeybees and wild bees in a watermelon field. *Scientia Horticulturae* 204: 138-144.

- Guerra-Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A. 2008. Influence of honeybees brood pheromone on the production of triploid watermelon. *Cucurbitaceae 2008. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of cucurbitaceae*, Avignon, France, 21-24 May 2008 385-390.
- Harder, L.D., Barrett, S.C.H. 1996. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. En Lloyd, D. G., Barrett, S. C. H. (eds.), *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*, pp. 140-190. Chapman & Hall, New York.
- Huitrón, M.V., Diaz, M., Diáñez, F., Camacho, F., Valverde, A. 2007. Effect of 2,4-D and CPPU on triploid watermelon production and quality. *HortScience* 42: 559-564.
- Junta de Andalucía. 2021. *Observatorio de Precios y Mercados. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía*. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?ec=default> [Accedido 16 de septiembre de 2021].
- Kendall, L.K., Evans, L.J., Gee, M., Smith, T.J., Gagic, V., Lobaton, J.D., Hall, M.A. et al. 2021. The effect of protective covers on pollinator health and pollination service delivery. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 319: 107556.
- Kremen, C., Williams, N.M., Thorp, R.W. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 16812-16816.
- Layek, U., Kundu, A., Bisui, S., Karmakar, P. 2021. Impact of managed stingless bee and western honeybee colonies on native pollinators and yield of watermelon: A comparative study. *Annals of Agricultural Sciences* 66: 38-45.
- Mann, L.K. 1943. Fruit shape of watermelon as affected by placement of pollen on stigma. *Botanical Gazette* 105: 257-262.
- Marchese, J.I., Johnson, G.J., Delaney, D.A. 2015. Exposure effects on the productivity of commercial *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) quads during bloom in watermelon fields. *Journal of Economic Entomology* 108: 1810-1817.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- Maynard, D.N. 1989. Triploid watermelons: a new version of an old crop. *American Vegetable Grower* 37: 42-43.
- Munyuli, T. 2014. Influence of functional traits on foraging behaviour and pollination efficiency of wild social and solitary bees visiting coffee (*Coffea canephora*) flowers in Uganda. *Grana* 53: 69-89.
- Njoroge, G., Gemmill-Herren, B., Bussmann, R., Newton, L., Ngumi, V. 2010. Diversity and efficiency of wild pollinators of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) at Yatta (Kenya). *Journal of Applied Horticulture* 12: 35-41.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.W. 2004. Pollination ecology of *Citrullus lanatus* at Yatta, Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science* 24: 73-77.
- Petropoulou, Y., Georgiou, O., Psaras, G., Manetas, Y. 2001. Improved flower advertisement, pollinator rewards and seed yield by enhanced UV-B radiation in the Mediterranean annual *Malcolmia maritima*. *New Phytologist* 152: 85-90.
- Pisanty, G., Afik, O., Wajnberg, E., Mandelik, Y. 2016. Watermelon pollinators exhibit complementarity in both visitation rate and single-visit pollination efficiency. *Journal of Applied Ecology* 53: 360-370.

- Rader, R., Cunningham, S.A., Howlett, B.G., Inouye, D.W. 2020. Non-bee insects as visitors and pollinators of crops: Biology, ecology, and management. *Annual Review of Entomology* 65: 391-407.
- Reche, J. 1994. *Cultivo intensivo de la sandía*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Rollin, O., Bretagnolle, V., Decourtye, A., Aptel, J., Michel, N., Vaissière, B.E., Henry, M. 2013. Differences of floral resource use between honeybees and wild bees in an intensive farming system. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 179: 78-86.
- Sawe, T., Eldegard, K., Totland, Ø., Macrice, S., Nielsen, A. 2020. Enhancing pollination is more effective than increased conventional agriculture inputs for improving watermelon yields. *Ecology and Evolution* 10: 5343-5353.
- Schaffer, A.A., Paris, H.S. 2016. Melons, Squashes, and Gourds. En *Reference Module in Food Science*, pp. B9780081005965033000. Elsevier.
- Spaethe, J., Briscoe, A.D. 2005. Molecular characterization and expression of the UV opsin in bumblebees: three ommatidial subtypes in the retina and a new photoreceptor organ in the lamina. *The Journal of Experimental Biology* 208: 2347-2361.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1998. Seed production in watermelon: A comparison between two commercially available pollinators. *HortScience* 33: 28-30.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1997. The effects of honeybee and bumblebee pollination on fruit set and abortion of cucumber and watermelon. *American Bee Journal* 137: 386-391.
- Stebbins, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms I: Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307-326.
- Taha, E.-K.A., Bayoumi, Y.A. 2009. The value of honeybees (*Apis mellifera*, L.) as pollinators of summer seed watermelon (*Citrullus lanatus colothyntoides* L.) in Egypt. *Acta Biologica Szegediensis* 53: 33-37.
- Van der Niet, T., Peakall, R., Johnson, S.D. 2014. Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany* 113: 199-212.
- Walters, S.A. 2005. Influence of honeybee pollination on triploid watermelon fruit set and quality. *HortScience* 40: 1268-1270.
- Westphal, C., Steffan-Dewenter, I., Tschardtke, T. 2003. Mass flowering crops enhance pollinator densities at a landscape scale. *Ecology Letters* 6: 961-965.
- Wijesinghe, S.A.E.C., Evans, L.J., Kirkland, L., Rader, R. 2020. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Scientia Horticulturae* 271: 109493.
- Winfree, R., Williams, N.M., Dushoff, J., Kremen, C. 2007. Native bees provide insurance against ongoing honeybee losses. *Ecology Letters* 10: 1105-1113.

**CAPÍTULO VIII: COMPARACIÓN DE LA
PRODUCCIÓN DE SANDÍA ASOCIADA
DIPLOIDE Y TRIPLOIDE EN
INVERNADERO BAJO POLINIZACIÓN
CON SÍRFIDOS (*ERISTALINUS AENEUS*)
Y ABEJAS (*APIS MELLIFERA*)**



1. Introducción

La polinización de los cultivos ha cobrado especial importancia, debido a los problemas que sufren en la actualidad los insectos polinizadores naturales. La mayoría de los cultivos son polinizados por insectos, lo que propicia un alto valor económico y ecológico a estos sistemas de polinización. En ese sentido, la melitofilia es especialmente valiosa, ya que muchas de las plantas domesticadas y silvestres son polinizadas por himenópteros (Klein et al., 2007). Los dípteros son otro grupo de insectos que destaca por su importancia en la polinización de los cultivos (Larson et al., 2001; Willmer, 2011; Orford et al., 2015; Howlett y Gee, 2019; Cook et al., 2020; Doyle et al., 2020; Rader et al., 2020).

Uno de los cultivos con mayor dependencia de la entomofilia para la obtención de sus frutos es la sandía. La sandía es uno de los cultivos más importantes en términos económicos, superándose los 100 millones de toneladas de producción en más de 3 millones de hectáreas de superficie cultivada (FAOSTAT, 2021). La sandía puede cultivarse al aire libre y bajo abrigo en invernadero. Las plantaciones al aire libre son polinizadas principalmente por abejas melíferas (*Apis mellifera* L. o *Apis cerana* L.) (Wijesinghe et al., 2020). Sin embargo, el acceso de estos insectos al cultivo en las plantaciones de invernadero se ve dificultado por las barreras físicas que definen al invernadero. En invernadero, el principal polinizador empleado en España es la abeja melífera, con un mínimo de 3 colmenas por hectárea (Reche, 1994). Algunos trabajos muestran también la capacidad de abejorros y otras abejas silvestres de polinizar la sandía (Stanghellini et al., 1998; Njoroge et al., 2004, 2010; Bomfim et al., 2014; Marchese et al., 2015; Garantonakis et al., 2016; Pisanty et al., 2016; Campbell et al., 2018, 2019; Azo'o et al., 2020). No obstante, el uso de estos himenópteros en invernadero se ve a menudo dificultado por las condiciones adversas que les impiden desarrollar un comportamiento óptimo de forrajeo, lo que repercute negativamente sobre el rendimiento y la calidad del fruto (Heinrich, 1974, 1980; Vogt, 1986; Dag y Eisikowitch, 1995; Vaissière y Froissart, 1996; Occhiuzzi, 1999; Kwon y Saeed, 2003; Amano, 2004; Dag, 2008; Evans et al., 2019; Descamps et al., 2021; Kendall et al., 2021).

Los insectos que visitan las flores de sandía son numerosos. Abejas melíferas, abejorros, abejas solitarias y diferentes lepidópteros, dípteros y coleópteros realizan visitas florales a este cultivo (Free, 1993; Stanghellini et al., 1998; Souza et al., 1999;

Njoroge et al., 2004, 2010; Taha y Bayoumi, 2009; Garantonakis et al., 2016; Campbell et al., 2018). Sin embargo, no todos estos insectos son polinizadores legítimos al no realizar un transporte y deposición eficiente de polen (Layek et al., 2021). La estructura de las flores de sandía, con un plano muy abierto y una corola poco profunda, parece relacionado con una variedad de visitantes diferentes a las abejas (Stanghellini et al., 2002). Entre los polinizadores alternativos destacan los sírfidos cristalinos, ya que presentan óptimas características. Su gran tamaño, su larga probóscide y su alta pilosidad (Gilbert, 1985; van Veen, 2004) les permiten transportar gran cantidad de polen entre flores. Los sírfidos, además, muestran patrones de forrajeo con muchas visitas florales y resistencia a condiciones adversas como las de un invernadero (Capítulo 6). La eficacia polinizadora de un insecto se determina a través de su comportamiento y transporte de polen, que a su vez repercutirá en el éxito reproductivo de la planta. Es imprescindible, por tanto, que un polinizador muestre un forrajeo óptimo, con visitas constantes y sin discriminar entre distintos tipos de flores que limiten la polinización de nuestro cultivo (Ne'eman et al., 2010).

Este capítulo tiene por objetivo comparar la eficacia polinizadora de los sírfidos cristalinos (*Eristalinus aeneus*) frente a la polinización tradicional con abejas (*Apis mellifera*) en un cultivo protegido de sandía con variedades diploides y triploides, evaluando tanto la producción como la calidad de los frutos. Además, se comparará la actividad (visitas florales) y eficacia polinizadora (adhesión de polen en las flores) en ambos insectos. Este estudio permitirá concretar un sistema de polinización alternativo al actual en este cultivo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Ubicación del ensayo y material biológico

Los ensayos se llevaron a cabo en la Estación Experimental Fundación Cajamar de El Ejido (Almería, España) (36°47'42.0"N, 2°43'19.4"W) durante las primaveras de 2019 y de 2020 (Figura 1). Los invernaderos utilizados en 2019 eran de tipo inacral con una superficie total de 432 m². Los invernaderos estaban compuestos por dos capillas de 9 m, orientadas E-O, con dimensiones de 18 m de anchura y 24 m de largo, con una altura en la canaleta de 2,60 m y 3,95 m de altura en cumbrera (Figura 1: naves 27, 30). Los invernaderos de los ensayos de 2020 eran de tipo multitúnel con una superficie de 630 m² cada uno, con 22,5 m de anchura y 28,0 m de largo. Los invernaderos contaban con

ventilación pasiva mediante ventanas laterales (norte y sur) y cenitales en cada capilla del invernadero, con malla anti-insectos de 20 x 10 hilos cm^{-2} . Estos invernaderos contaban con tres capillas de 7,5 m orientadas en dirección E-O, con una altura de canaleta de 3,0 m y 4,5 m en cumbrera (Figura 1: naves 1 y 3). En las cuatro naves, durante los dos años de ensayos, los invernaderos contaron con una cubierta plástica tricapa no fotoslectiva,



Figura 1. Fotografía aérea de la Estación Experimental Fundación Cajamar mostrando la ubicación de los recintos 1, 2, 27 y 30, en los que se desarrollaron los ensayos.

La plantación de sandía correspondía con la variedad comercial Premium (cultivar diploide) y Fashion (cultivar triploide), con una ratio de plantación 1:3 y un marco de plantación de 0.25 plantas/ m^2 (Figura 2). El manejo del cultivo fue realizado según las recomendaciones técnicas de la Estación Experimental Fundación Cajamar.



Figura 2. Separación de las repeticiones con plantas de sandía. Apréciase al fondo la introducción de los insectos polinizadores en cajas de suelta

El ensayo se desarrolló con un diseño experimental de bloques al azar con 2 tratamientos y 4 pseudo-réplicas (Figura 2). Para ello, en el interior de cada nave se construyeron un total de 4 semi-aislamientos laterales con geotextil, cada uno con una superficie de 32 m², incluyendo 6 plantas triploides y 2 diploides en su interior durante 2019, y una superficie de 64 m² y 12 plantas triploides y 4 diploides en su interior durante 2020. En estos recintos se llevó a cabo la polinización mediante abejas melíferas, con la colocación de una colmena por recinto o, alternativamente por sírfidos cristalinos, mediante la introducción de pupas de *E. aeneus* a una densidad de 30 individuos por m². La colocación de las pupas y la colmena de abejas se realizó el 23 de abril de 2019 y el 24 de abril de 2020. Esta introducción de los polinizadores coincidió con la aparición de las primeras flores femeninas, aproximadamente 40 días después del trasplante y con previo despunte de los tallos.

El registro de los datos climáticos de temperatura y humedad dentro de los invernaderos en ambos años se llevó a cabo con un aspirpsicrómetro ventilado de bulbo seco y bulbo húmedo ventilado, con una sonda PT-100. La gestión del clima se realizó mediante un controlador climático (PRIVA B.V., De Lier, Países Bajos), que registraba la información y gestionaba la apertura y cierre de bandas laterales y ventanas cenitales, con una temperatura de consigna de apertura de 26°C. Las temperaturas medias, mínimas y máximas, al igual que la HR fue similar en ambos años y en las naves donde se desarrollaron los ensayos (Cuadro 1, Figura 3).

Cuadro 1. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) (Media ± SD) registradas en los invernaderos durante 2019 y 2020.

Parámetro	Año 2019		Año 2020	
	Nave 27	Nave 30	Nave 1	Nave 3
Temperatura media	21,72 ± 1,92	22,68 ± 2,27	22,87 ± 6,05	22,65 ± 2,37
Temperatura máxima	30,29 ± 2,92	32,41 ± 3,70	31,58 ± 3,24	30,83 ± 3,17
Temperatura mínima	15,43 ± 1,65	15,40 ± 1,74	15,79 ± 1,61	16,02 ± 1,62
Humedad relativa media	69,44 ± 6,66	65,68 ± 6,25	66,36 ± 8,60	66,62 ± 8,68
Humedad relativa máxima	88,57 ± 3,06	86,10 ± 2,50	89,89 ± 9,98	89,22 ± 10,07
Humedad relativa mínima	44,50 ± 9,15	38,94 ± 11,07	44,67 ± 7,48	45,75 ± 7,45

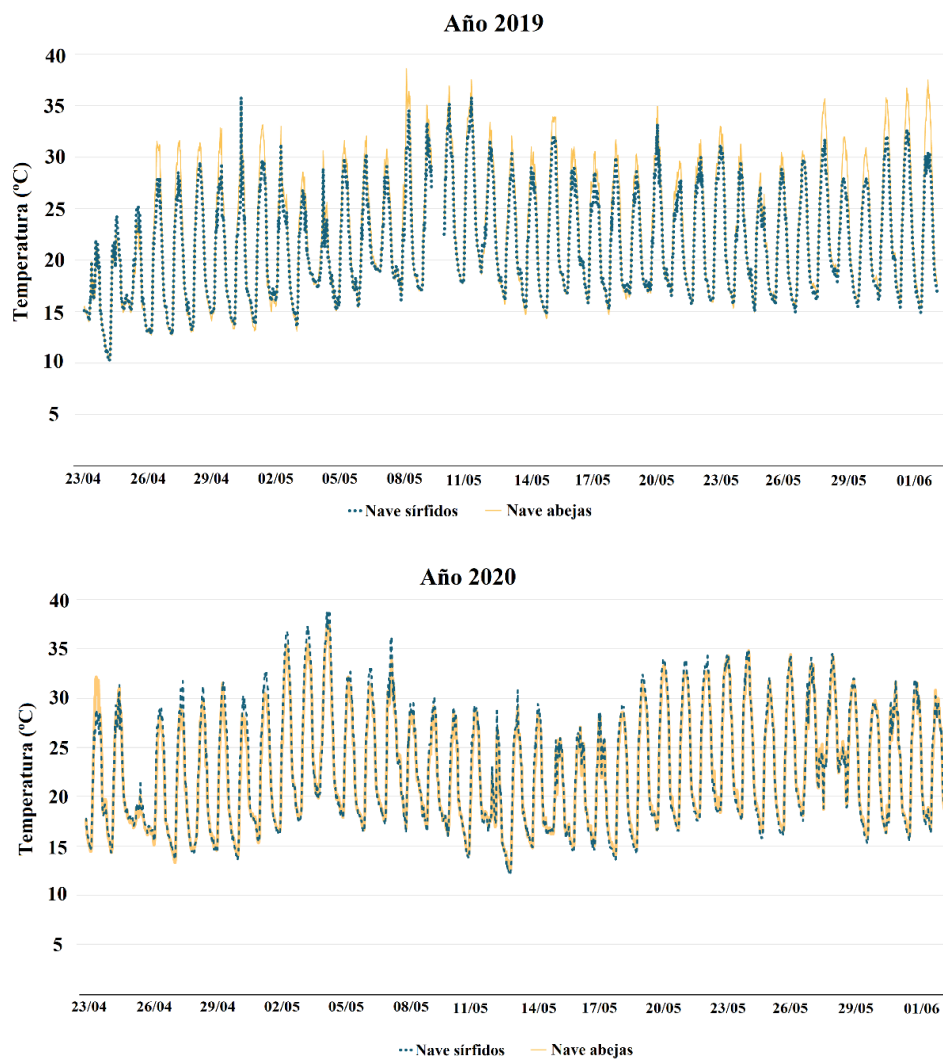


Figura 3. Evolución de las temperaturas registradas en los cerramientos en ambos años de estudio.

2.2. Parámetros evaluados

Visitas florales

Durante el segundo año del ensayo, y con el objetivo de estudiar las diferencias en el comportamiento de los dos insectos evaluados, se cuantificó el número de visitas florales y la duración de las mismas. Para ello, se observaron las visitas a tres flores estaminadas y tres pistiladas en cada recinto, durante 3 días no consecutivos a lo largo de la floración, con un total de 36 flores observadas (18 flores pistiladas y 18 estaminadas). Las flores, seleccionadas al azar en el momento de la observación, mostraban las características típicas de los cultivares triploides, con mayor tamaño de pétalos y del ovario en el caso de las flores pistiladas. La hora de observación fue entre las 11:00 y las 12:00, con un tiempo de observación de 3 minutos por flor. La visita fue considerada legítima únicamente cuando los sírfidos entraron en contacto con las partes reproductivas de la flor durante más de 2 segundos.

Interacción polen-pistilo

Durante el segundo año de ensayos se evaluó la interacción polen-pistilo en el cultivar triploide. Para ello, se recogieron diez flores de cada tratamiento de polinización en tres días no consecutivos durante la floración, con un total de 60 flores (30 flores en el tratamiento de los sírfidos y 30 en el de abejas). Se determinó la cantidad de polen adherido en cada uno de los tres lóbulos que conforman el estigma, y en la totalidad de la flor. Las flores, previamente marcadas al azar, fueron recolectadas transcurridas 48 horas tras su antesis y conservadas en FAE (formalina, ácido acético glacial y etanol al 70 %, en una proporción 1:2:17 v/v). En laboratorio, se analizaron bajo microscopía de epifluorescencia (Nikon E600) tras tinción con azul de anilina (Martin, 1959), determinándose la adhesión del polen en el estigma (Figura 6). También se determinó el número de granos de polen germinados, expresándose como el porcentaje de granos de polen germinados sobre los adheridos. El crecimiento del tubo polínico fue cuantificado a través de una escala (0: ningún tubo polínico; 1: 1-50 tubos; 2: 51-100; 3: >100) para cada uno de los tres estilos que suceden a los lóbulos estigmáticos. Posteriormente se sumó el valor de cada lóbulo para obtener la estimación completa a nivel de flor, y se expresó en porcentaje de flores para los siguientes rangos: nulo (sin tubos polínicos), escaso (1-150), moderado (151-300) y masivo (más de 300).

Cuajado del fruto, cosecha y componentes

La eficacia polinizadora tanto del sírfido *Eristalinus aeneus* como de la abeja *Apis mellifera* fue evaluada a través del cuajado y la producción final de frutos en ambos cultivares, diploides y triploides. Durante 2020, se determinó además el número de semillas por fruto y la relación con su tamaño en 3 frutos diploides y 3 triploides para cada tratamiento y pseudo réplica, mediante el conteo de las mismas en $\frac{1}{4}$ del fruto. Las semillas del cultivar diploide fueron fácilmente reconocibles, ya que se desarrollan por completo y presentaban colores oscuros. Sin embargo, en el cultivar triploide la aparición de semillas blancas y tiernas hizo más difícil el conteo.

La caracterización de la cosecha se realizó mediante el pesado y categorización de los frutos. La categorización de los frutos se hizo en función al Reglamento (CE) N° 1862/2004 de la Comisión de 26 de octubre de 2004 por el que se establece la norma de comercialización de las sandías. Las sandías triploides se clasificaron como primera categoría para los frutos no deformes, con color uniforme y peso superior a 2 kg. La segunda categoría contempla frutos ligeramente deformes o con pesos inferiores a 2 kg. Por último, los frutos no incluidos en las otras dos categorías se clasificaron como destrío, correspondiendo con frutos rajados o excesivamente deformes y con peso que no superaba el mínimo de 1 kg en triploides. En el caso de los frutos diploides, al tratarse de variedades “mini”, el peso mínimo establecido para la categoría primera fue de 1,5 kg y de 1 kg para la segunda. Respecto a la calidad del fruto, en 2020, se determinó el contenido de sólidos solubles (que ha de ser superior a 8° Brix por este mismo reglamento), en 2 frutos de plantas diploides y 2 triploides de cada tratamiento y pseudoréplica. Para ello, se empleó un refractómetro digital ATAGO PR-101 α , tomándose un valor medio de tres registros de la pulpa de cada fruto.

2.3 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico R Core Team (2021). Tanto el número de visitas como la duración de las mismas en flores pistiladas y estaminadas fueron analizadas mediante Modelos Lineales Generalizados (GLM). En el caso de la duración de las visitas el modelo fue desarrollado con previa transformación en raíz cuadrada de la variable dependiente (tiempo en segundos). En ambos casos, las variables independientes consideradas fue el tipo de flor visitada (pistilada versus estaminada). Los modelos finales fueron seleccionados comparando el valor AICc

(Akaike Information Criterion) frente al valor de los modelos completos. Para comparar diferencias en el comportamiento de forrajeo de ambos polinizadores para cada tipo de flor se llevó a cabo una comparación mediante una prueba T-Student para dos muestras independientes (con un 95% de confianza), tanto para la duración como para el número de visitas florales. Los datos de adhesión y germinación de polen fueron comparados para ambos insectos mediante una prueba U Wilcoxon Mann Whitney, con un 95% de confianza. El coeficiente de variación entre el número de granos de polen adheridos en cada lóbulo estigmático fue comparado para ambos polinizadores mediante una prueba U Wilcoxon Mann Whitney, con un 95% de confianza, previa transformación angular de la variable. El porcentaje de flores con rangos de polen adherido (0-499; 500-999; >1.000) fue comparado a través de tablas de contingencia Chi cuadrado para ambos tratamientos, previa transformación arcoseno.

Los datos de producción fueron expresados como número de frutos por planta, peso medio de los frutos y rendimiento del cultivo, junto con su desviación estándar, para ambos cultivares, diploides y triploides. Posteriormente, se realizaron comparaciones de ambos tratamientos de polinización a través de una prueba T-Student para dos muestras independientes, con un 95% de confianza. Además, se comparó el número de semillas y contenido en sólidos solubles (° Brix) para frutos polinizados por los diferentes insectos con el mismo procedimiento. La distribución de los frutos según categorías comerciales se comparó previa transformación arcoseno, realizándose una prueba T-Student para dos muestras independientes, con un 95% de confianza. Por último, el rendimiento teórico (t/ha) fue determinado considerando el ratio de plantación para los cultivares diploides y triploides (1:3), e igualmente fue determinado el rendimiento teórico económico (€/ha) aplicando los precios de venta indicados en el Cuadro 2 (Junta de Andalucía, 2021).

Cuadro 2. Precio (€/kg) del cultivar diploide y triploide de sandía, según categoría del fruto, para los meses de junio de 2019 y 2020.

Variedad	Categoría	Año 2019	Año 2020
Diploide	Categoría I	0,25	0,19
	Categoría II	0,09	0,08
Triploide	Categoría I	0,32	0,31
	Categoría II	0,17	0,07

3. Resultados y Discusión

Visitas florales

Tanto las abejas como los sírfidos realizaron visitas a ambos tipos de flores, pistiladas y estaminadas. En las 36 flores observadas, se registraron un total de 144 visitas durante 2020, de las cuales 70 las realizaron sírfidos (33 en flores pistiladas y 37 en estaminadas) y 74 abejas (24 en flores pistiladas y 50 en estaminadas). Se observó, por tanto, que el número de visitas recibidas en las flores estuvo influido por el tipo de flor y la interacción del polinización con el tipo de flor (Cuadro 3).

Cuadro 3. Modelo lineal generalizado (Análisis de la devianza, tipo III) para el número de visitas a las flores de sandía. Las variables independientes fueron el polinizador y tipo de flor (pistilada y estaminada).

	S.C.	G.L.	F-valor	Pr (>F)
Polinizador	4,50	1	4,10	0,0513 .
Tipo de flor	37,56	1	34,23	< 0,0001 ***
Polinizador*Tipo de flor	13,44	1	12,25	0,0014 **
Residuos	35,11	32		

En este ensayo, las flores pistiladas recibieron el mismo número de visitas por ambos polinizadores, sin diferencias entre ellos ($t = -1,809$; $df = 15,87$; $p = 0,0890$). Por el contrario, el número de visitas a las flores estaminadas fue significativamente superior para las abejas frente a sírfidos ($t = 3,38$; $df = 15,96$; $p = 0,0038$) (Cuadro 4). Esto se debe a la marcada preferencia de los himenópteros hacia el polen. El polen es el principal recurso para el mantenimiento de las larvas en la mayoría de las abejas y por ello han desarrollado comportamientos para recoger eficazmente grandes cantidades de polen (Thorp, 2000). Esto determina las preferencias por las flores que ofrecen este recurso. Estas preferencias entre diferentes líneas de cultivo y cultivares se han estudiado en varias cucurbitáceas incluyendo melón y sandía (Wolf et al., 1999; Kiill et al., 2014).

Cuadro 4. Visitas florales realizadas por ambos insectos polinizadores (Media \pm SE; mínimos y máximos entre paréntesis), en flores pistiladas y estaminadas en el ensayo de 2020, durante los 3 minutos de observación.

	Flores pistiladas	Flores estaminadas
Abejas	2,08 \pm 0,22 (1 – 4)	3,34 \pm 0,24 (1 – 7)
Sírfidos	2,48 \pm 0,23 (1 – 6)	2,65 \pm 0,22 (1 – 6)

Un alto número de visitas a las flores pistiladas de sandía es un requisito fundamental para asegurar el cuajado y la calidad comercial de sus frutos (Adlerz, 1966; Stanghellini et al., 1997; Walters, 2005; Winfree et al., 2007; Guerra-Sanz y Roldán-Serrano, 2008), ya que se trata de frutos multiseñados. Según diferentes autores se estiman necesarias entre 10 y 60 visitas a las flores pistiladas de sandía para asegurar su cuajado y la calidad de sus frutos (Adlerz, 1966; Stanghellini et al., 1997; Walters, 2005; Winfree et al., 2007). En este ensayo, las flores estaminadas recibieron un mayor número de visitas por ambos polinizadores, en comparación con las pistiladas, siendo significativamente mayor por las abejas (abejas: 111,1 visitas/h; sírfidos: 82,2 visitas/h). Un mayor número de visitas en las flores estaminadas facilita una mayor carga polínica en el cuerpo del insecto. Cada semilla de este tipo de frutos es el resultado de la fecundación de un óvulo por un grano de polen. Por ello, un alto número de visitas debe suceder antes de su cierre, ya que las flores pistiladas permanecen receptivas sólo unas 9 horas después de su apertura (Bomfim et al., 2015). En este ensayo, la ratio de visitas en flores pistiladas fue de 53,3 visitas/h en abejas y de 73,3 visitas/h en los sírfidos.

Respecto a la duración de las visitas, tanto el tipo de flor como el tipo de polinizador tuvieron efectos significativos (Cuadro 5). El tiempo invertido en las flores estaminadas fue diferente según polinizador ($t = -6,68$; $df = 36,16$; $p < 0,0001$), solo 6 segundos en abejas y de hasta 46 s en sírfidos (Cuadro 6). También hubo diferencias significativas en la duración de la visita a la flor pistilada según insecto ($t = -5,11$; $df = 33,35$; $p < 0,0001$). Esta duración fue de 12 segundos para las abejas y de 37 segundos en los sírfidos. Aunque los tiempos mínimos fueron similares, tanto el promedio como los valores máximos presentaron grandes diferencias según el tipo de insecto (Cuadro 6).

Cuadro 5. Modelo lineal generalizado (Análisis de la devianza, tipo III) para la duración de las visitas a las flores de sandía. Las variables independientes incluidas fueron el polinizador y el tipo de flor (femenina y masculina).

	S.C.	G.L.	F-valor	Pr (>F)
Polinizador	71,25	1	25,498	< 0,0001 ***
Tipo de flor	15,49	1	5,545	0,0199 *
Polinizador*Tipo de flor	20,36	1	7,288	0,0078 **
Residuos	391,19	140		

Cuadro 6. Duración de las visitas (segundos) (Media \pm SE; mínimos y máximos entre paréntesis), realizadas por ambos insectos polinizadores a flores pistiladas y estaminadas en 2020, durante los 3 minutos de observación.

	Flores pistiladas	Flores estaminadas
Abejas	12,21 \pm 0,70 (6 – 20)	6,32 \pm 0,28 (2 – 10)
Sírfidos	37,09 \pm 4,82 (4 – 127)	46,08 \pm 5,95 (3 – 178)

La duración de la visita floral afecta de manera directa a la cantidad y distribución de los granos de polen en el estigma, siendo mejor con mayores tiempos de visita floral y repetidos movimientos dentro de la flor pistilada (Munyuli, 2014). El tiempo empleado por los sírfidos en ambos tipos de flores fue superior al de las abejas melíferas, y similares al de otras abejas silvestres, que emplean un promedio de 57 s en las visitas a las flores de sandía (Araújo et al., 2014; Garantonakis et al., 2016). El modo de recolectar el polen en este tipo de flores por las abejas se corresponde con movimientos de frotamiento del abdomen y tórax con las anteras de la flor estaminada (Portman et al., 2019). Sin embargo, los sírfidos realizan movimientos circulares alrededor del estambre, lo cual implica más tiempo invertido en la visita floral.

Los sírfidos no presentan preferencia floral hacia las flores estaminadas, que sí se observa en las abejas (Njoroge et al., 2004). Sin embargo, el mayor tiempo de visita empleado por los sírfidos permitiría una mayor carga polínica. Por otra parte, el mayor número y duración de sus visitas a las flores pistiladas, en comparación con abejas, proporcionaría una mayor efectividad polinizadora, frente a la mayor eficiencia mostrada por abejas, donde sucede un menor número de visitas más cortas (Ne’eman et al., 2010).

Interacción polen-pistilo

Los máximos valores de polen adherido se detectaron en la polinización con abejas melíferas (Figura 4, Cuadro 7). Se encontró una gran variabilidad en el número de granos de polen adheridos al estigma de las flores polinizadas por los dos tipos de insectos (Figura 4). En todas las flores polinizadas por abejas se halló polen, a diferencia de los sírfidos, donde se halló una flor sin polen depositado.

Cuadro 7. Adhesión y germinación de polen (n° granos y %) y escala del crecimiento de tubos polínicos (Media ± SE; valores mínimos y máximos entre paréntesis) en el estigma de la flor triploide en cada tratamiento. Año 2020.

	Adhesión (n° granos de polen/estigma)	Germinación (n° granos de polen/estigma)	Germinación (%)	Categoría crecimiento tubos polínicos. Escala 0 – 3
Abejas	1.397,23 ± 174,18 (35 – 4.382)	794,30 ± 97,08 (16 – 2.444)	58,16 ± 2,04 (38,5 – 82,0)	2,60 ± 0,12 (0 – 3)
Sírfidos	1.240,40 ± 137,29 (0 – 2.410)	637,10 ± 59,31 (34 – 1.120)	53,26 ± 3,22 (39,0 – 100,0)	2,43 ± 0,17 (1 – 3)

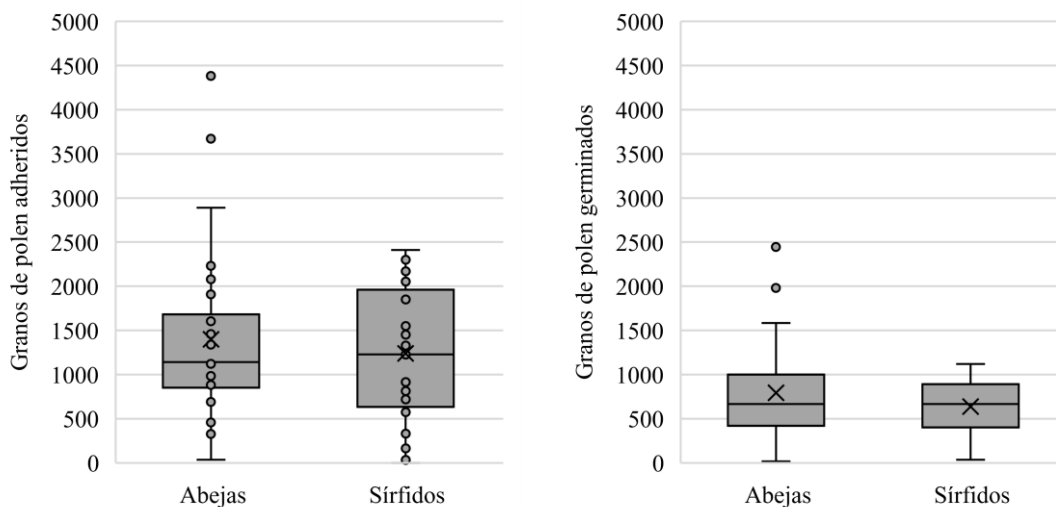


Figura 4. Diagrama de caja y bigotes para el número de granos de polen adheridos (izquierda) y germinados (derecha) para ambos tratamientos durante el año 2020

El porcentaje de flores que no alcanzó un mínimo de 500 granos de polen adheridos resultó igual en ambos tratamientos, con un 17% en ambos casos. El porcentaje de flores con entre 500 y 999 granos de polen adheridos fue superior en sírfidos (30% vs. 23%), pero lo contrario ocurrió con las flores con más de 1.000 granos de polen adheridos

(60% versus 53%). No obstante, no hubo diferencias significativas en ningún rango de granos de polen depositados ($\chi^2 = 1,3582$; $df = 2,00$; $p = 0,5071$).

No se encontraron diferencias significativas ni en la cantidad de polen adherido ($W = 473,50$; $p = 0,7283$), ni en la cantidad de granos de polen germinados ($W = 507,00$; $p = 0,3994$), siendo ligeramente superior en ambos casos en las flores polinizadas por abejas (Cuadro 7, Figura 4). Sin embargo, la distribución del polen adherido entre los diferentes lóbulos estigmáticos mostró diferencias entre tratamientos de polinización ($W = 581,00$; $p = 0,0266$). En el caso de las flores polinizadas por abejas, el coeficiente de variación (CV) en el número de granos de polen adheridos en los diferentes lóbulos estigmáticos estuvo entre el 1,8 y el 61,2%, con una media del CV del 22,9%. En el caso de los sírfidos, la distribución de polen fue más uniforme y el CV fue menor, variando entre el 3,3 y el 57,0%, con una media del 16,4%. En el caso del porcentaje de granos de polen adheridos y posteriormente germinados fue del 53,3% en el caso de los sírfidos y del 58,2% en el caso de las abejas, sin diferencias significativas ($W = 543,00$; $p = 0,1034$). El número de tubos polínicos que alcanzaron la base del estilo tampoco fue diferente entre tratamientos ($W = 469,50$; $p = 0,7209$).

Diferentes publicaciones afirman que para que el fruto de sandía cuaje, es necesario que se depositen entre 500 y 1.000 granos de polen de manera uniforme en los 3 lóbulos del estigma (Mann, 1943; Adlerz, 1966; Maynard, 1989; Free, 1993; Delaplane y Mayer, 2000). Una elevada variabilidad en el número de granos de polen adheridos en los tres lóbulos estigmáticos puede afectar a la calidad de los frutos (Mann, 1943), y en este ensayo, se ha observado una mayor variabilidad entre estigmas de la misma flor cuando la polinización se realizó por abejas. En cuanto a cantidad, el mínimo requerido de granos de polen suele ser alcanzado con un número de visitas entre 10 y 60, en el caso de himenópteros de gran tamaño (abejas y abejorros) (Adlerz, 1966; Stanghellini et al., 1997; Walters, 2005; Winfree et al., 2007). En este ensayo no se determinó la capacidad de transporte de polen de ambos insectos, pero algunas investigaciones previas muestran que las abejas melíferas, junto con los abejorros, son capaces de transportar mayor cantidad de polen en comparación con insectos más pequeños (Winfree et al., 2007). Por ello, se considera que en el caso de los sírfidos, se requiere un mayor número de visitas a las flores pistiladas para cuajar el fruto. Aunque las abejas realicen un menor número de visitas menos duraderas a las flores pistiladas (Cuadro 4 y 6), su mayor capacidad de transporte de polen se vio reflejada en la deposición de polen. Es decir, no resulta

necesario un mayor número de visitas para cargar mayor cantidad de polen que posteriormente depositan en la flor pistilada. Los sírfidos, aun mostrando una mayor tasa de visitas a las flores masculinas, su menor capacidad de carga afectaría a la cantidad de polen depositada en las flores pistiladas. Sin embargo, en ambos casos el porcentaje de flores con la cantidad de polen requerida para el cuajado de frutos superó el 80%. Por lo tanto, se interpreta que este sírfido se trata de un polinizador menos eficiente pero igualmente efectivo (Ne'eman et al., 2010).

Cuajado del fruto, cosecha y componentes

Los primeros frutos cuajados se observaron entre cinco y siete días después de la suelta (dds) e introducción de las colmenas. En el caso de la polinización con abejas, el cuajado de frutos apareció con mayor precocidad, siendo pronunciado durante los primeros 15 días tras la introducción de la colmena. Con la polinización por sírfidos, se registró un menor ritmo de aparición de frutos, siendo más prolongado en el tiempo hasta lograr un cuajado óptimo 25 dds (Figura 5). Esto sugiere que el inicio de la actividad polinizadora en los sírfidos fue más tardía que con las abejas melíferas y que en su manejo debe considerarse el período necesario desde la colocación de la caja con individuos en estado de pupa, hasta la emergencia en forma de adulto alado.

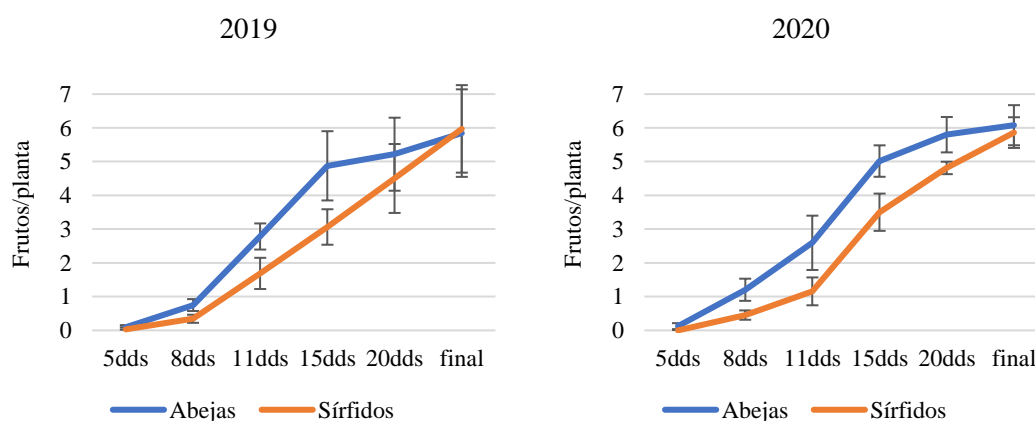


Figura 5. Evolución del cuajado de frutos (frutos/planta) para ambos polinizadores en 2019 (izquierda) y 2020 (derecha).

La recolección de los frutos durante ambos años sucedió con una semana de diferencia para ambos tratamientos, siendo más temprana en la plantación polinizada por abejas melíferas. Esto se explica por el retraso en el inicio de la actividad polinizadora de los sírfidos. Por ello, se debería adelantar la introducción de los sírfidos, anticipándose al protocolo establecido para la colocación de las colmenas de abejas melíferas.

En 2019, la media de frutos por planta diploide obtenidos con la polinización por abejas fue de 8,3, frente a los 10,0 obtenidos con sírfidos. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($t = -0,96$; $df = 3,88$; $p = 0,3950$). De igual modo, no se observaron diferencias significativas durante 2019 en el número de frutos por planta triploide ($t = 0,61$; $df = 4,83$; $p = 0,5685$) (Cuadro 8). En el ensayo de 2020 se repitieron estos patrones de producción, no obteniéndose diferencias significativas ni en el cultivar diploide ($t = -1,67$; $df = 4,17$; $p = 0,1681$) ni en el triploide ($t = 1,06$; $df = 4,99$; $p = 0,3366$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Frutos por planta (Media \pm SE) obtenidos mediante polinización por melitofilia y miofilia. Años 2019 y 2020

	2019		2020	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Abejas	8,25 \pm 0,66 (6,50 – 9,50)	5,44 \pm 0,60 (3,80 – 4,58)	7,19 \pm 0,61 (6,25 – 9,00)	5,71 \pm 0,53 (4,67 – 7,17)
Sírfidos	10,00 \pm 1,70 (5,50 – 13,50)	5,02 \pm 0,35 (4,40 – 6,00)	8,31 \pm 0,28 (7,75 – 9,00)	5,04 \pm 0,33 (4,25 – 5,58)

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en el peso de los frutos diploides ($t = 0,19$; $df = 4,44$; $p = 0,8581$) o triploides ($t = 0,42$; $df = 5,82$; $p = 0,6888$) en 2019. De igual modo, en 2020, el peso de los frutos fue similar en ambos tratamientos, tanto para los frutos diploides ($t = 0,48$; $df = 6,00$; $p = 0,6461$) como para los triploides ($t = -1,82$; $df = 3,64$; $p = 0,1502$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Peso (kg) de los frutos de sandía diploides y triploides en ambos años del ensayo para la polinización con abejas y sírfidos

	2019		2020	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Abejas	2,90 \pm 0,19 (0,78 – 5,25)	3,94 \pm 0,23 (0,08 – 8,93)	2,91 \pm 0,18 (0,93 – 4,50)	4,39 \pm 0,07 (0,24 – 7,26)
Sírfidos	2,82 \pm 0,38 (0,11 – 5,26)	3,81 \pm 0,19 (0,08 – 7,07)	2,79 \pm 0,18 (0,75 – 5,19)	4,78 \pm 0,21 (0,35 – 10,20)

En parte por ello, el rendimiento del cultivo durante 2019 no difirió ni en la variedad diploide ($t = -0,83$; $df = 5,47$; $p = 0,4400$) ni triploide ($t = 0,99$; $df = 4,82$; $p = 0,3684$). Al igual sucedió en 2020, donde no hubo diferencias significativas en el cultivar

diploide ($t = -1,54$; $df = 4,42$; $p = 0,1909$) y triploide ($t = 0,37$; $df = 5,34$; $p = 0,7253$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Rendimiento del cultivo (kg/m²) de sandía según cultivares en los diferentes tratamientos de polinización

	2019		2020	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Abejas	5,94 ± 0,46 (5,39 – 7,33)	5,28 ± 0,46 (4,36 – 6,55)	5,15 ± 0,18 (4,64 – 5,45)	6,24 ± 0,51 (5,26 – 7,67)
Sírfidos	6,60 ± 0,64 (4,98 – 7,80)	4,75 ± 0,27 (4,22 – 5,46)	5,78 ± 0,36 (5,10 – 6,52)	6,01 ± 0,35 (4,95 – 6,47)

Por último, tampoco se obtuvieron diferencias significativas en 2020 en el índice de semillado, ni en los frutos diploides ($t = -1,06$; $df = 25,72$; $p = 0,3001$) ni en los triploides ($t = 0,51$; $df = 27,33$; $p = 0,6120$). Tampoco hubo diferencias significativas en los grados brix de los frutos diploides ($t = -1,18$; $df = 9,99$; $p = 0,2646$) o triploides ($t = -1,19$; $df = 8,98$; $p = 0,2632$), según insecto polinizador (Cuadro 11).

Algunos trabajos relacionan un mayor número de visitas florales en sandía a un mayor dulzor de sus frutos (Walters, 2005; Guerra-Sanz & Serrano, 2008). En este caso, las diferencias en grados brix en los frutos recolectados fueron ligeras (Cuadro 11) y pueden ser atribuidas a la recolección más tardía en la parcela polinizada por sírfidos (Figura 5). No obstante, en ambos casos se cumplen los estándares de calidad impuestos por el Reglamento (CE) N° 1862/2004.

Cuadro 11. Número de semillas en 1/4 del fruto en los cultivares diploides y triploides de sandía para ambos años

	Semillas		Grados Brix	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Abejas	286,87 ± 13,59	241,60 ± 11,64	10,43 ± 0,42	10,53 ± 0,43
Sírfidos	311,13 ± 18,49	232,40 ± 13,64	11,15 ± 0,44	11,17 ± 0,31

Respecto a la calidad de los frutos, durante 2019 no hubo diferencias significativas en el porcentaje de frutos de categoría I ni en el cultivar diploide ($t = -1,35$; $df = 5,28$; $p = 0,2324$) ni en el triploide ($t = -1,22$; $df = 4,21$; $p = 0,2851$). Al igual sucedió con los frutos de categoría II, donde tampoco se hallaron diferencias en el cultivar diploide ($t = 2,98$; $df = 3,00$; $p = 0,0584$) o triploide ($t = 0,54$; $df = 3,53$; $p = 0,6219$). Por último, tampoco hubo diferencias en el destrío del cultivar diploide ($t = -0,50$; $df = 6,00$; $p =$

0,6367) o triploide ($t = 1,04$; $df = 3,47$; $p = 0,3671$) (Figura 6). En 2020, no hubo diferencias en el porcentaje de frutos de categoría I para el cultivar diploide ($t = -1,23$; $df = 5,03$; $p = 0,2748$), pero sí en el triploide ($t = -2,71$; $df = 5,98$; $p = 0,0350$), siendo este porcentaje superior en sírfidos. De igual modo, el porcentaje de frutos correspondientes a la categoría II mostró diferencias significativas en el cultivar triploide ($t = 2,71$; $df = 5,65$; $p = 0,0372$), pero no en el diploide ($t = 1,06$; $df = 5,04$; $p = 0,3389$). Sin embargo, en los frutos catalogados como destrío no hubo diferencias en ningún caso ($t = 0,97$; $df = 5,48$; $p = 0,3707$ para los diploides; $t = -0,58$; $df = 4,86$; $p = 0,5904$ para los triploides) (Figura 6). Las diferencias en el porcentaje de frutos triploides de primera y segunda categoría para la polinización con abejas se explican por la deformidad que presentaban o por un peso inferior al establecido por el reglamento y pudo deberse a la peor distribución del polen entre los tres lóbulos estigmáticos, que favorece la aparición de frutos asimétricos, no perfectamente esféricos (Mann, 1943).

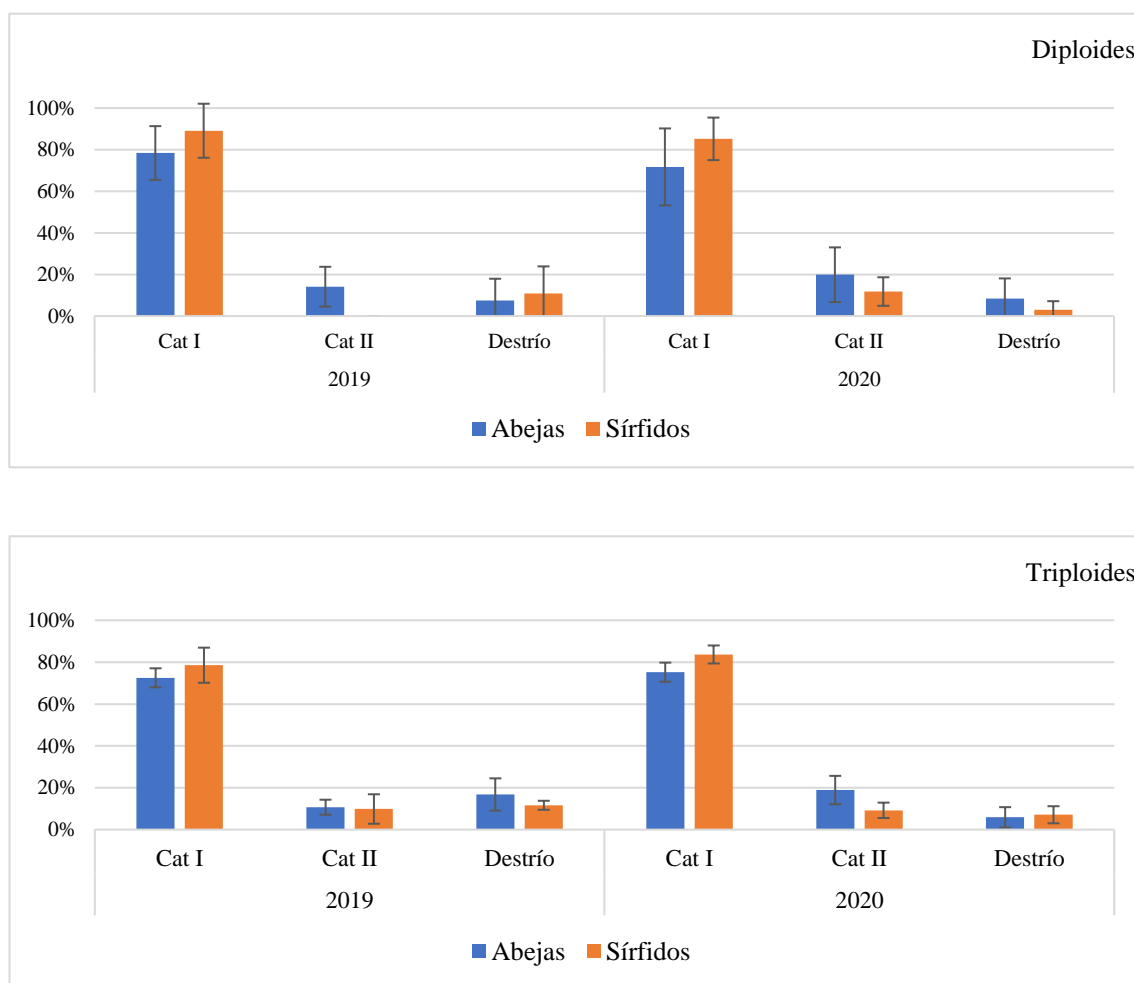


Figura 6. Porcentaje de frutos diploides (arriba) y triploides (abajo) según categoría y tratamientos de polinización

Por último, el rendimiento teórico estimado fue similar en ambos sistemas de polinización en términos de producción (t/ha) y rendimiento económico (€/ha) (Cuadros 12 y 13).

Cuadro 12. Rendimiento teórico (t/ha) del cultivo de sandía considerando los frutos comerciales (categoría I y II) para ambos cultivares. Años 2019 y 2020

	Año 2019		Año 2020	
	Diploide	Triploide	Diploide	Triploide
Abejas	19,21	34,56	16,32	40,59
Sírfidos	21,59	31,13	19,09	39,33

Cuadro 13. Rendimiento económico teórico (€/ha) del cultivo para ambos años del ensayo.

	Año 2019			Año 2020		
	Diploide	Triploide	Total	Diploide	Triploide	Total
Abejas	4.449,71	10.701,38	15.151,09	2.779,23	11.223,05	14.002,28
Sírfidos	5.396,86	9.621,48	15.018,34	3.479,81	11.703,07	15.182,88

En este ensayo, el rendimiento teórico durante 2019 en el cultivar diploide fue un 11% superior mediante el uso de sírfidos. Sin embargo, en el cultivar triploide el uso de abejas supuso un incremento igual del 11% respecto a la polinización con sírfidos. En 2020, el uso de sírfidos supuso un incremento del rendimiento teórico del cultivar diploide del 14%, pero descendió un 3% en el triploide respecto al uso de abejas (Cuadro 12). El manejo de la polinización en sandía establece, de manera general, la colocación de un mínimo de dos o tres colmenas de abejas por hectárea para lograr una óptima polinización. En el caso de cultivares diploides y triploides en asociación, la población de abejas debería ser mayor cuanto menor sea la proporción del cultivar diploide (Adlerz, 1966; Reche, 1994). En este ensayo, la población de abejas fue superior a la recomendada, puesto que en ambos años se colocó una colmena en una superficie de 420 y 600 m² según año. Por ello, los rendimientos fueron óptimos para ambos cultivares. Tanto el número de frutos como el rendimiento por planta y el rendimiento teórico en cultivares triploides fue superior en la polinización por abejas en ambos años (Cuadro 8, 10 y 12). Esto sugiere aumentar la densidad de sírfidos introducida en el cultivo con el objetivo de igualar los rendimientos obtenidos con los polinizadores habituales. En este sentido, aunque algunos autores indican que un mayor número de visitantes a las flores podría afectar negativamente a la polinización en algunas plantas (Mayfield et al., 2001), el

Capítulo 7 de esta Tesis demuestra que una mayor densidad (45 individuos/m²) aumenta los rendimientos.

En resumen, en este capítulo, se confirma la viabilidad del sírfido *Eristalinus aeneus* como polinizador alternativo a la abeja melífera en el cultivo protegido de sandía. No obstante, es necesario establecer un protocolo de suelta para la polinización de cultivares asociados de sandía diploide y triploide. Este protocolo debe estar basado en una densidad óptima de suelta, entre 30 y 45 individuos/m², y adelantar el momento de suelta.

4. Bibliografía

Adlerz, W.C. 1966. Honeybee visit numbers and watermelon pollination. *Journal of Economic Entomology* 59: 28-30.

Amano, K. 2004. Attempts to introduce stingless bees for the pollination of crops under greenhouse conditions in Japan. *Technical bulletin (Asian and Pacific Council. Food & Fertilizer Technology Center)* 167: 1-9.

Araújo, D., Siqueira, K., Duarte, P., Silva, N. 2014. Comportamento de forrageamento de *Apis mellifera* na melancia (*Citrullus lanatus*) no município de Juazeiro, BA. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 9: 59-67.

Azo'o, E.M., Bissou, W.B., Tchuengem, F.F.N. 2020. Comparing the foraging behaviour and pollination efficiency of *Apis mellifera* with *Xylocopa olivacea* (Apidae: Hymenoptera) on *Citrullus lanatus* flowers. *Journal of Applied Horticulture* 22: 18-23.

Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., de Aragão, F.A.S., Freitas, B.M. 2014. Adaptive and foraging behavior of two stingless bee species in greenhouse mini watermelon pollination. *Sociobiology* 61: 502-509.

Bomfim, I.G.A., Bezerra, A.D. de M., Nunes, A.C., Freitas, B.M., Aragão, F.A.S. de. 2015. Pollination requirements of seeded and seedless mini watermelon varieties cultivated under protected environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50: 44-53.

Campbell, J.W., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2018. Fruit set and single visit stigma pollen deposition by managed bumble bees and wild bees in *Citrullus lanatus* (Cucurbitales: Cucurbitaceae). *Journal of Economic Entomology* 111: 989-992.

Campbell, J.W., Stanley-Stahr, C., Bammer, M., Daniels, J.C., Ellis, J.D. 2019. Contribution of bees and other pollinators to watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) pollination. *Journal of Apicultural Research* 58: 597-603.

Cook, D.F., Voss, S.C., Finch, J.T.D., Rader, R.C., Cook, J.M., Spurr, C.J. 2020. The role of flies as pollinators of horticultural crops: an Australian case study with worldwide relevance. *Insects* 11: 341.

Dag, A. 2008. Bee pollination of crop plants under environmental conditions unique to enclosures. *Journal of Apicultural Research* 47: 162-165.

Dag, A., Eisikowitch, D. 1995. The influence of hive location on honeybee foraging activity and fruit set in melons grown in plastic greenhouses. *Apidologie* 26: 511-519.

- Delaplane, K.S., Mayer, D.F. 2000. *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing Series, Wallingford, United Kingdom.
- Descamps, C., Jambrek, A., Quinet, M., Jacquemart, A.-L. 2021. Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. *Insects* 12: 493.
- Doyle, T., Hawkes, W.L.S., Massy, R., Powney, G.D., Menz, M.H.M., Wotton, K.R. 2020. Pollination by hoverflies in the Anthropocene. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287: 20200508.
- Evans, L.J., Cutting, B.T., Jochym, M., Janke, M.A., Felman, C., Cross, S., Jacob, M., Goodwin, M. 2019. Netted crop covers reduce honeybee foraging activity and colony strength in a mass flowering crop. *Ecology and Evolution* 9: 5708-5719.
- FAOSTAT. 2021. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data> [Accedido 20 de agosto de 2021].
- Free, J.B. 1993. *Insect pollination of crops*. Academic Press, London.
- Garantonakis, N., Varikou, K., Birouraki, A., Edwards, M., Kalliakaki, V., Andrinopoulos, F. 2016. Comparing the pollination services of honeybees and wild bees in a watermelon field. *Scientia Horticulturae* 204: 138-144.
- Gilbert, F.S. 1985. Diurnal activity patterns in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Ecological Entomology* 10: 385-392.
- Guerra-Sanz, J.M., Roldán-Serrano, A. 2008. Influence of honeybees brood pheromone on the production of triploid watermelon. *Cucurbitaceae 2008. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of cucurbitaceae, Avignon, France, 21-24 May 2008* 385-390.
- Heinrich, B. 1980. Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera*: II. Regulation of thoracic temperature at high air temperatures. *Journal of Experimental Biology* 85: 73-87.
- Heinrich, B. 1974. Thermoregulation in bumblebees. *Journal of comparative physiology* 88: 129-140.
- Howlett, B.G., Gee, M. 2019. The potential management of the drone fly (*Eristalis tenax*) as a crop pollinator in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 72: 221-230.
- Junta de Andalucía. 2021. *Observatorio de Precios y Mercados. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía*. Disponible en: <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?ec=default> [Accedido 16 de septiembre de 2021].
- Kendall, L.K., Evans, L.J., Gee, M., Smith, T.J., Gagic, V., Lobaton, J.D., Hall, M.A. et al. 2021. The effect of protective covers on pollinator health and pollination service delivery. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 319: 107556.
- Kiill, L., Siqueira, K., Coelho, M., Silva, T., Gama, D., Araújo, D.C.S., Pereira, J. 2014. Frequency and foraging behavior of *Apis mellifera* in two melon hybrids in Juazeiro, state of Bahia, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86: 2049-2055.
- Klein, A.-M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 303-313.
- Kwon, Y.J., Saeed, S. 2003. Effect of temperature on the foraging activity of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) on greenhouse hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Applied Entomology and Zoology* 38: 275-280.

- Larson, B.M.H., Kevan, P.G., Inouye, D.W. 2001. Flies and flowers: taxonomic diversity of anthophiles and pollinators. *The Canadian Entomologist* 133: 439-465.
- Layek, U., Kundu, A., Bisui, S., Karmakar, P. 2021. Impact of managed stingless bee and western honeybee colonies on native pollinators and yield of watermelon: A comparative study. *Annals of Agricultural Sciences* 66: 38-45.
- Mann, L.K. 1943. Fruit shape of watermelon as affected by placement of pollen on stigma. *Botanical Gazette* 105: 257-262.
- Marchese, J.I., Johnson, G.J., Delaney, D.A. 2015. Exposure Effects on the Productivity of Commercial *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) Quads During Bloom in Watermelon Fields. *Journal of Economic Entomology* 108: 1810-1817.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- Mayfield, M.M., Waser, N.M., Price, M.V. 2001. Exploring the 'Most Effective Pollinator Principle' with Complex Flowers: Bumblebees and *Ipomopsis aggregata*. *Annals of Botany* 88: 591-596.
- Maynard, D.N. 1989. Triploid watermelons: a new version of an old crop. *American Vegetable Grower* 37: 42-43.
- Munyuli, T. 2014. Influence of functional traits on foraging behaviour and pollination efficiency of wild social and solitary bees visiting coffee (*Coffea canephora*) flowers in Uganda. *Grana* 53: 69-89.
- Ne'eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S.G., Dafni, A. 2010. A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85: 435-451.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.M. 2010. Diversity and efficiency of wild pollinators of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) at Yatta (Kenya). *Journal of Applied Horticulture* 12: 35-41.
- Njoroge, G.N., Gemmill, B., Bussmann, R., Newton, L.E., Ngumi, V.W. 2004. Pollination ecology of *Citrullus lanatus* at Yatta, Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science* 24: 73-77.
- Occhiuzzi, P. 1999. Stingless bees thrive in glasshouse trial. *Aussie Bee* 12: 8-11.
- Orford, K.A., Vaughan, I.P., Memmott, J. 2015. The forgotten flies: the importance of non-syrphid Diptera as pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20142934.
- Pisanty, G., Afik, O., Wajnberg, E., Mandelik, Y. 2016. Watermelon pollinators exhibit complementarity in both visitation rate and single-visit pollination efficiency. *Journal of Applied Ecology* 53: 360-370.
- Portman, Z.M., Orr, M.C., Griswold, T. 2019. A review and updated classification of pollen gathering behavior in bees (Hymenoptera, Apoidea). *Journal of Hymenoptera Research* 71: 171-208.
- Rader, R., Cunningham, S.A., Howlett, B.G., Inouye, D.W. 2020. Non-bee insects as visitors and pollinators of crops: Biology, ecology, and management. *Annual Review of Entomology* 65: 391-407.
- Reche, J. 1994. *Cultivo intensivo de la sandía*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

- Souza, D.T.M., Tadeu, A.M., Bettini, P.C., Toledo, V. de A.A. de. 1999. Importância dos insetos na produção de melancia (*Citrullus lanatus* Thunb.) - Cucurbitaceae. *Acta Scientiarum. Agronomy* 21: 579-583.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1998. Seed production in watermelon: A comparison between two commercially available pollinators. *HortScience* 33: 28-30.
- Stanghellini, M.S., Ambrose, J.T., Schultheis, J.R. 1997. The effects of honeybee and bumble bee pollination on fruit set and abortion of cucumber and watermelon. *American Bee Journal* 137: 386-391.
- Stanghellini, M.S., Schultheis, J.R., Ambrose, J.T. 2002. Pollen mobilization in selected Cucurbitaceae and the putative effects of pollinator abundance on pollen depletion rates. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 729-736.
- Taha, E.-K., Bayoumi, Y. 2009. The value of honeybees (*Apis mellifera* L.) as pollinators of summer seed watermelon (*Citrullus lanatus* colothyntoides L.) in Egypt. *Acta Biologica Szegediensis* 53: 33-37.
- Thorp, R.W. 2000. The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution* 222: 211-223.
- Vaissière, B.E., Froissart, R. 1996. Pollination of Cantaloupes under spun bonded row cover by honey bees (Hymenoptera: Apidae) in West Africa. *Journal of Economic Entomology* 89: 1213-1222.
- van Veen, M.P. 2004. *Hoverflies of Northwest Europe: Identification keys to the Syrphidae*. KNNV Publishing, The Netherlands.
- Vogt, F.D. 1986. Thermoregulation in bumblebee colonies. I. Thermoregulatory versus brood-maintenance behaviors during acute changes in ambient temperature. *Physiological Zoology* 59: 55-59.
- Walters, S.A. 2005. Honeybee pollination requirements for triploid watermelon. *HortScience* 40: 1268-1270.
- Wijesinghe, S.A.E.C., Evans, L.J., Kirkland, L., Rader, R. 2020. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Scientia Horticulturae* 271: 109493.
- Willmer, P. 2011. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press.
- Winfree, R., Williams, N.M., Dushoff, J., Kremen, C. 2007. Native bees provide insurance against ongoing honeybee losses. *Ecology Letters* 10: 1105-1113.
- Wolf, S., Lensky, Y., Paldi, N. 1999. Genetic variability in flower attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.) within the Genus *Citrullus*. *HortScience* 34: 860-863.

CAPÍTULO IX: DISCUSIÓN GENERAL



DISCUSIÓN GENERAL

El declive de los polinizadores es un problema mundial que se está incrementando considerablemente durante los últimos años. En el caso de los polinizadores manejados, durante los años 90, el desarrollo comercial del abejorro (*Bombus terrestris*) como vector de polinización manejado supuso una gran revolución en la polinización de los cultivos protegidos (Navarro, 1994). Sin embargo, el desarrollo industrial de otros polinizadores se ha visto estancado, siendo numerosos los insectos que se encuentran actualmente en evaluación, pero no comercializados (Osterman et al., 2021). Idealmente, las soluciones a este desafío deben desarrollarse mediante polinización natural basada en una mayor biodiversidad, que abra la puerta a la complementariedad funcional con los polinizadores habitualmente empleados en horticultura (Blüthgen y Klein, 2011; Miñarro et al., 2018).

El término polinizador se utiliza frecuentemente para todo visitante de las flores, sin embargo, no todas las visitas resultan en una transferencia eficaz de polen (King et al., 2013; Page et al., 2021). El insecto polinizador más eficaz será aquel que muestre capacidad de adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales donde se desarrollen los cultivos y transfiera polen viable en gran cantidad. Para ello, debe visitar frecuentemente las flores durante la dehiscencia de las anteras y la receptividad estigmática, presentando constancia floral, aunque el cultivo presente características morfológicas, biológicas o recompensas heterogéneas.

Esta Tesis Doctoral ha estado dedicada a la validación de los sírfidos eristalinos como agentes polinizadores en cultivos frutales y hortícolas bajo invernadero. En concreto, este trabajo demuestra la eficacia polinizadora del sírfido *Eristalinus aeneus* en mango y sandía, en condiciones de cultivo protegido en el Sureste español. Para ello, se estudió la morfología y biología floral, destacando también el análisis de los atractivos y recompensas florales en ambos cultivos (Capítulo II y Capítulo V). Además, se ha establecido la relación planta-polinizador, estudiando su comportamiento y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales en las que se desarrollan ambos cultivos (Capítulo III y VI), para finalmente determinar su eficacia polinizadora mediante el análisis de la producción de ambos cultivos (Capítulos IV, VII y VIII).

En primer lugar, se determinó la biología y recompensas florales de los cultivos de mango y sandía. En ambos cultivos, las flores han presentado características que resultan atractivas para los sírfidos. A pesar de las notables diferencias entre las flores de

sandía y mango, en ambos casos se trata de flores planas, discoidales y con orientación hacia arriba. El pequeño tamaño de las flores de mango estaría relacionado con la atracción de pequeños insectos. Además, la flor cuenta con un disco nectario apropiado para el aparato bucal de los dípteros. La flor de sandía, por el contrario, presenta en todos sus tipos mayor tamaño en comparación con las de mango. Sin embargo, sus nectarios ubicados a poca profundidad, junto con su exposición por encima del cultivo rastrero facilita el acceso a gran diversidad de insectos. En ambos cultivos se observa un mayor tamaño en las flores receptoras del polen: hermafroditas en mango y pistiladas triploides en sandía, ejerciendo por tanto una mayor atracción hacia los polinizadores.

Las flores estudiadas presentan coloraciones amarillas, en sandía, y amarillentas y rosadas en mango. Los sírfidos adultos son visitantes generalistas de flores con las características descritas anteriormente (Waser, 1983; Rotheray y Gilbert, 2011; An et al., 2018; Wojcik, 2021). Estos insectos utilizan el color, así como los patrones destacados de algunas estructuras florales y componentes como el néctar, guías nectarías y falsos nectarios, para orientar diversas acciones, como el forrajeo (Lunau, 2014; Lunau et al., 2020). En algunas especies de sírfidos se ha observado que logran encontrar con mayor facilidad el recurso si está marcado por guías nectarías (Dinkel y Lunau, 2001). Sin embargo, otros autores han encontrado que la ausencia de esta reflectancia ultravioleta (UV) en las flores afecta al aterrizaje de las abejas, pero no de los dípteros (Klomberg et al., 2019). En este ensayo, se observó que *E. aeneus* realizaba aterrizajes directos en las flores de ambos cultivos, aunque no presentaran los mismos patrones de coloración y reflectancia UV. En el caso de mango, la mayor reflectancia se halló en los discos nectararios, a diferencia de la sandía, donde el polen de la flor estaminada resaltó sobre el resto de las estructuras florales. En las flores pistiladas de sandía no se halló reflectancia de luz, pero de igual modo se observó un acercamiento directo de los sírfidos durante el vuelo, lo que apoya la idea de que no afecta definitivamente al aterrizaje de los dípteros. En estos cultivos, se ha observado una extensión de la probóscide de *E. aeneus* sobre las anteras y los nectarios. Por tanto, se considera que, tal y como plantea Klecka et al., (2018), el acercamiento de los sírfidos a las flores en estos cultivos se debe a la preferencia floral y no a su sistema de visión. Otros mecanismos no estudiados en esta Tesis Doctoral, como la presencia de componentes volátiles orgánicos (VOCs) emitidos por las flores, juegan un papel importante en la atracción de los polinizadores a las flores.

Una vez atraídos a la flor, la ingesta de las recompensas florales es fundamental para la supervivencia de los sírfidos adultos. Su estructura bucal corresponde a una probóscide especializada en la succión de líquidos, siendo por ello el néctar la recompensa floral más fácil de ingerir. Además, el néctar también lo digieren más fácilmente, puesto que se metaboliza rápido y les aporta la energía necesaria para la actividad (Rotheray & Gilbert, 2011). En esta Tesis Doctoral se observó que *E. aeneus* se alimentaba de néctar en todas las flores, tanto del cultivo de sandía como del cultivo de mango. Este recurso fue el más tomado por los sírfidos en el cultivo de mango y fue también constantemente consumido en sandía. En el caso de la ingesta de recompensas sólidas, como el polen, deben previamente proceder a su disolución con saliva (Rotheray y Gilbert, 2011). El polen en ambos cultivos presenta altos contenidos en proteínas, lípidos, azúcares, y otros componentes (Capítulo II y V). Las proteínas y aminoácidos son esenciales para el desarrollo de los órganos reproductores de los sírfidos y para la posterior oviposición en las hembras (Gilbert, 1981, 1985; Haslett, 1989; Lundgren, 2009). En este sentido, también se observó a *E. aeneus* alimentarse de polen en ambos cultivos, llegando incluso a ser la recompensa floral más habitual tomada de las flores estaminadas de sandía, frente al propio néctar que también ofrecía esa flor. Cabe destacar que días posteriores al inicio de la actividad polinizadora en ambos cultivos se observaron cópulas entre los sírfidos, lo que pondría de manifiesto la correcta maduración de los órganos reproductores.

La actividad polinizadora de los insectos se ve modificada por la cantidad y calidad de las recompensas presentes en la flor (Galen y Plowright, 1985; Thomson, 1986; Harder y Barrett, 1996). Aunque en esta Tesis Doctoral se detectaron diferencias en la composición nutricional de las recompensas en función del tipo de flor, e incluso de cultivar en sandía, esto no derivó en discriminación floral hacia cultivares, sexo de flor o incluso hora del día para realizar las visitas a las flores (Capítulo II, III, V y VI). Sin embargo, sí que se observó un incremento de la actividad de vuelo conforme aumentaba la cantidad de néctar disponible en las flores. A diferencia de los sírfidos, las abejas presentan fuertes modificaciones de su comportamiento de forrajeo en sandía en función a la disponibilidad de recursos florales y del cultivar (Wolf et al., 1999; Taha y Bayoumi, 2009). En el cultivo de mango, y debido a la baja cantidad de recompensas florales que presenta, las abejas se ven obligadas a pecorear en plantas colindantes para obtener recursos necesarios para mantener sus grandes colonias (Free y Williams, 1976; Du Toit y Swart, 1993; Sung et al., 2006).

El siguiente paso de esta Tesis Doctoral ha sido determinar la actividad y el comportamiento de este insecto en el cultivo protegido de mango y sandía (Capítulo III y VI). *Eristalinus aeneus* presentó una gran adaptación a las condiciones ambientales extremas que pueden producirse en el interior del invernadero. Se observó en ambos cultivos que el patrón de vuelo de *E. aeneus* estuvo muy influenciado por la intensidad lumínica, pero también por la temperatura y en menor medida por la humedad relativa. En el cultivo de mango, la actividad de *E. aeneus* se observó a amplios rangos de temperatura, entre 17,8 y 37,4 °C, intensidad lumínica entre 8,2 y 57,4 klux, y humedad relativa entre 19,0 y 88,8%. Así mismo, en sandía esta especie mantuvo actividad en rangos de temperatura (27,1–36,7 °C), intensidad lumínica (9,2–72,3 klux) y humedad relativa (29,0–57,2%).

El tiempo de vuelo de *E. aeneus* en ambos cultivos se situó entre diez y once horas. En el cultivo de sandía, se observó que la actividad no estuvo directamente relacionada con los ritmos de apertura y cierre floral, puesto que, tras el cierre de las flores en torno a las 18:00, la actividad continuaba en búsqueda de alimento, con intentos de introducir la probóscide en la flor. Sin embargo, debido a esa falta de alimento, la actividad de vuelo descendió, aunque las condiciones ambientales aún eran favorables para el vuelo. Por el contrario, en mango la flor permanece abierta desde su anthesis hasta su marchitez algunos días después, debiéndose el fin de su actividad diaria a los factores ambientales y no al cierre de la flor. Durante su actividad, *E. aeneus* destina más tiempo al forrajeo, con porcentajes superiores al 60%. El tiempo empleado en la visita a las flores fue incluso superior en la mañana. Este comportamiento es destacable, puesto que la mayor receptividad estigmática y probabilidad de cuaje sucede durante la mañana en cultivos como la sandía, y coincide con el comportamiento de otras especies de este grupo (Gilbert, 1985).

En su comportamiento de forrajeo, se observa que *E. aeneus* realiza un alto número de visitas florales tanto en mango como en sandía. Además, estas visitas se han dado en todos los tipos florales presentes en el cultivo, sin mostrar discriminación floral. Este sírfido visita en mango tanto las flores hermafroditas y estaminadas, en búsqueda de polen y néctar. En esta especie, ambas flores ofrecen las dos recompensas al polinizador, pero se observaron más visitas proporcionalmente a flores hermafroditas, considerando su menor presencia en la unidad floral. No obstante, una mayor accesibilidad a las mismas podría explicar también este comportamiento. En la sandía, una clara preferencia floral

por parte del insecto polinizador supondría un grave problema para el cuajado de frutos, puesto que la fuente de polen viable reside en las flores estaminadas de la variedad diploide (Subasinghe-Arachchige et al., 2022). Por ello, se requiere que el polinizador visite ambos cultivares y ambos tipos de flor durante las aproximadamente nueve horas que dura la antesis. En este caso, *E. aeneus* mostró también una alta tasa de visitas florales, sin mostrar preferencias en función del cultivar (diploide o triploide) o tipo de flores (pistilada o estaminada), a diferencia de lo observado en abejas (Wolf et al., 1999; Taha y Bayoumi, 2009). También se pudo observar que su búsqueda de alimento estaba basada tanto en el polen como en el néctar, y mantuvo un constante comportamiento de forrajeo hasta el cierre de las flores.

El siguiente requisito para establecer la idoneidad de *E. aeneus* como polinizador del cultivo de sandía y mango fue su capacidad de transportar polen y depositarlo del modo requerido en el estigma de las flores hermafroditas (en mango) y pistiladas (en sandía) (Capítulos IV y VII). En esta Tesis Doctoral, la eficacia polinizadora se midió a través de la deposición total de polen en las flores pistiladas y por el posterior cuajado de frutos en respuesta a la polinización. En mango, se pudo observar cómo *E. aeneus* cargaba un gran número de granos de polen en su cuerpo, tal y como muestran otros trabajos (Jiron y Hedstrom, 1985; Huda et al., 2015; Usha y Srivastava, 2018). Además, se pudo comprobar la relación entre la adhesión de polen al estigma de la flor y el número de individuos introducidos en el cultivo. Puesto que el mango se trata de un fruto unisemillado no se requiere gran cantidad de polen en su estigma para lograr el cuajado del fruto. No obstante, se pudo observar un efecto positivo de esa mayor adhesión, reflejado en un mayor número de frutos y más calidad (calibre y peso) de estos. Esto es debido a la competencia entre tubos polínicos y su velocidad de crecimiento a través del estilo (Hormaza y Herrero, 1992), que afecta al cuajado de los frutos, calidad de las semillas y características de los frutos (Mulcahy y Mulcahy, 1987; Delph y Havens, 1998). En el caso de la sandía, al tratarse de un fruto multiseemillado, se requiere la adhesión de un alto número de granos de polen, conseguido mediante un alto ratio de visitas florales (Wijesinghe et al., 2020). En sandía, la densidad de suelta introducida en el cultivo fue determinante para la cantidad de polen adherido y germinado en el estigma de las flores de sandía, lográndose los mínimos granos de polen requeridos a densidades medias y altas de suelta. Se establece, por tanto, que la capacidad polinizadora de *E. aeneus* reside en su eficacia y no en su eficiencia, debido a que se requiere un mayor

número de polinizadores para obtener una mayor deposición final de polen en el estigma (Ne'eman et al., 2010).

El último factor determinante para establecer la eficacia polinizadora de un insecto responde a la producción y rendimiento del cultivo polinizado. Por ello, esta Tesis Doctoral precisa y pretende obtener información suficiente para establecer el manejo óptimo de este insecto como vector de polinización en estos dos cultivos bajo abrigo. El pilar fundamental es determinar una densidad óptima de suelta en los cultivos. En esta Tesis Doctoral se mostró que hay notables diferencias en el rendimiento tanto de sandía como de mango en función de la densidad de *E. aeneus* introducida en el cultivo.

El cultivo de mango al aire libre presenta naturalmente un bajo cuajado, usualmente por debajo del 0,1%, debido a una caída masiva de flores y frutitos en desarrollo (Singh, 1960). Este bajo cuajado de frutos forma parte de su estrategia reproductiva, pero es frecuente atribuir fracasos productivos a la autoincompatibilidad parcial que presenta y a los numerosos problemas relacionados con la polinización, la fertilización y bajas temperaturas durante floración, que causan aborto de semilla (Ramírez y Davenport, 2016). El ensayo sobre polinización del cultivo protegido de mango con tres densidades de suelta del sírfido *E. aeneus* indicó que todas las densidades probadas favorecían el cuajado de frutos frente a su ausencia (Figura 1) (Capítulo IV).

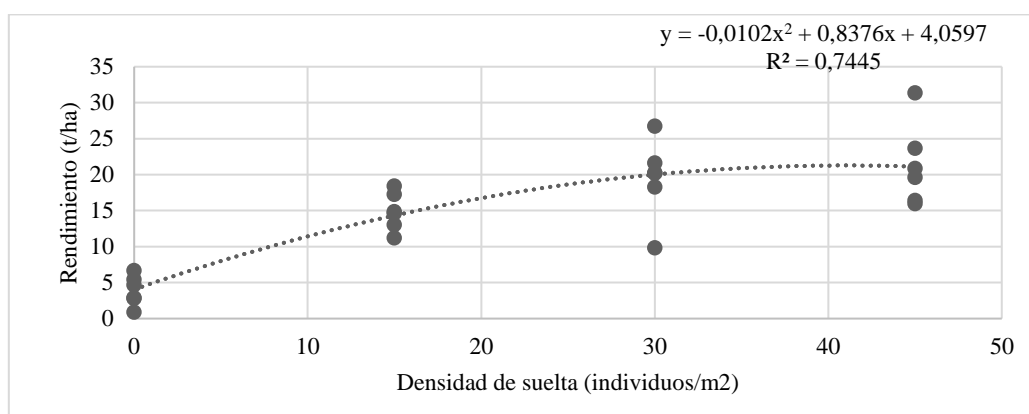


Figura 7. Regresión polinómica entre el número de individuos introducidos en el cultivo (ind/m^2) y el rendimiento obtenido en mango (t/ha) durante dos años de ensayos.

En este sentido, la introducción de sírfidos resultó en un aumento del cuajado frente al aislamiento de árboles sin insectos, como también frente al manejo habitual de polinización con abejorros comerciales. El rendimiento de este cultivo en invernadero en plantaciones monovarietales es similar al obtenido al aire libre, con unas 20 t/ha en plantaciones adultas (Galán-Saúco, 2014). Estos datos son similares a los obtenidos en

ambos años en este ensayo, e incluso superiores en 2020 para densidades de suelta de 30 y 45 individuos/m². La producción en invernadero con plantaciones adultas multivarietales bien desarrolladas puede incrementarse hasta los 37,5 t/ha (Galán Saúco, 2002). Cabe destacar que este ensayo se desarrolló en cerramientos monovarietales con árboles jóvenes, lo que seguro limitó el rendimiento. Se conoce que la polinización cruzada entre diferentes variedades de mango favorece la producción, mejorando el rendimiento (Galán-Saúco et al., 1997; Dag et al., 1998; El-Habashy et al., 2016; Pérez et al., 2016; Lucas-García et al., 2021).

En sandía, la falta de rendimiento se justifica a menudo por un déficit de polinización. Este fallo en la polinización suele deberse a la falta de polinizadores silvestres en los cultivos al aire libre o a un insuficiente forrajeo de los polinizadores comerciales en los cultivos protegidos. El ensayo desarrollado en esta Tesis Doctoral para el cultivo diploide y triploide asociado de sandía (1:3) mostró que la densidad de suelta afectó tanto al rendimiento del cultivo como a la calidad de los frutos (Capítulo VII). La introducción de *E. aeneus* con 30 y 45 individuos/m² derivó en un mayor rendimiento en el cultivar triploide, no siendo tan evidente en el diploide (Figura 2). Conseguir una adecuada transferencia de polen a los cultivares triploides es más difícil, debido a la esterilidad de su polen y a la mayor dificultad en el transporte de polen viable desde las plantas diploides (Harder y Barrett, 1996; Wijesinghe et al., 2020). Los rendimientos obtenidos fueron similares, e incluso superiores a altas dosis de suelta, a los establecidos por Reche (1994) en el cultivo protegido, de entre 4 y 6 kg/m².

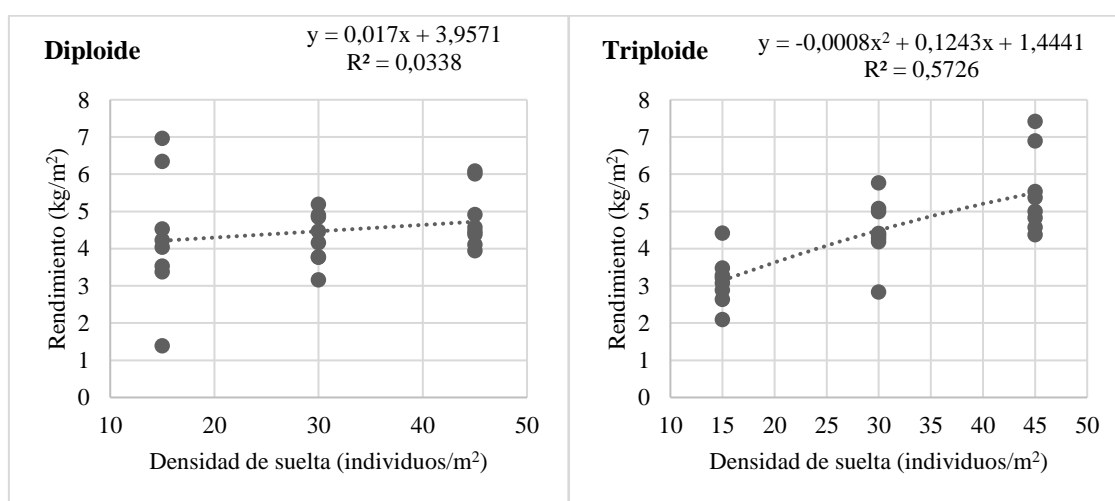


Figura 8. Regresión lineal y polinómica entre el número de individuos introducidos en el cultivo (ind/m²) y el rendimiento obtenido en sandía (kg/m²) diploide (izquierda) y triploide (derecha) durante dos años de ensayos.

Por ello, se establece que estas densidades de sueltas serían adecuadas para la polinización de un cultivo comercial de sandía con este diseño de polinización. No obstante, en el caso de que la variedad sea exclusivamente diploide, la densidad de suelta podría descender hasta los 15-30 individuos/m².

Por último, esta Tesis Doctoral ha demostrado que no existen diferencias en la polinización de sandía diploide y triploide realizada por sírfidos y por abejas melíferas (Capítulo VIII). Este ensayo mostró la eficacia polinizadora de *E. aeneus*, al no hallarse diferencias con los rendimientos del cultivo polinizado por abejas. El número de frutos por planta obtenido con la polinización por abejas fue ligeramente superior a la obtenida con sírfidos a una densidad de 30 individuos/m². Sin embargo, la calidad de los frutos fue ligeramente superior en el cultivo polinizado con sírfidos. Estos resultados en la calidad del fruto responden a una distribución más homogénea de los granos de polen en los tres lóbulos estigmáticos de la flor, requisito fundamental en este fruto (Mann, 1943). En este ensayo se pudo comprobar que los sírfidos dispersaban el polen de manera más eficiente por el estigma, debido a los movimientos realizados dentro de la flor y a la mayor duración de sus visitas, en comparación con las abejas.

En los ensayos de esta Tesis Doctoral, la introducción de *E. aeneus* se realizó con la aparición de las primeras flores en ambos cultivos. En el caso del mango, las panículas se encontraban elongadas con las primeras flores abriéndose. En sandía, el criterio fue la apertura de flores pistiladas, al igual que se realiza con abejas. Sin embargo, y en base a los resultados de precocidad de fruta, se recomienda la introducción de *E. aeneus* en sandía unos días antes de la apertura de flores pistiladas. Esto se debe a que la introducción se realiza en forma de pupa y transcurren varios días, en función de las condiciones ambientales, para que el adulto emerja y dé comienzo a su actividad polinizadora.

En los cultivos estudiados en esta Tesis Doctoral de mango y sandía, solo fue necesaria una única suelta, observándose una alta supervivencia de *E. aeneus* durante todo el período de floración. La alimentación de los sírfidos adultos a base de polen y azúcar favorece su longevidad, llegando a más de 60 días en el caso de *E. aeneus* en condiciones controladas en laboratorio, con promedios de 40 días (Hurtado, 2013; Campoy et al., 2020). No obstante, una fuente adicional de agua y azúcares, tal y como se practica habitualmente con otros polinizadores e insectos beneficiosos, podría alargar

la supervivencia del sírfido. En los ensayos desarrollados en esta Tesis Doctoral, se colocaron bebederos y fuentes de alimento en base a azúcar, sin embargo, no se observó gran atracción hacia ellos por los sírfidos, prefiriendo alimentarse sobre las flores. La mayor presencia de sírfidos en los bebederos sucede durante el cierre de las flores de sandía por la tarde.

La floración de la sandía presenta una corta duración, limitada además por el cuajado de frutos. Normalmente, la polinización con abejas sucede en aproximadamente 15 días. En sírfidos, el tiempo necesario para obtener el cuajado de frutos esperado fue superior (Capítulo VII), apoyando la idea de que es necesaria la introducción de los insectos polinizadores antes en el cultivo. No obstante, el período de floración no excede el período de supervivencia de este sírfido. Por su parte, el cultivo de mango presentó una duración de la floración mayor, pero tampoco requirió de una reintroducción de polinizadores. En caso de que se produzca una floración muy escalonada, se deberían realizar varias introducciones del polinizador a menor densidad.

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se concluye que *E. aeneus* es un polinizador válido tanto en mango como en sandía, pudiéndose adaptar el protocolo de suelta en otros cultivos, tanto hortícolas como frutales.

Bibliografía

An, L., Neimann, A., Eberling, E., Algora, H., Brings, S., Lunau, K. 2018. The yellow specialist: dronefly *Eristalis tenax* prefers different yellow colours for landing and proboscis extension. *The Journal of Experimental Biology* 221: jeb184788.

Blüthgen, N., Klein, A. 2011. Functional complementarity and specialisation: The role of biodiversity in plant–pollinator interactions. *Basic and Applied Ecology* 12: 282-291.

Campoy, A., Sáez, L., Pérez-Bañón, C., Rojo, S. 2020. Demography and population parameters of two species of eristaline flower flies (Diptera, Syrphidae, Eristalini). *Journal of Applied Entomology* 144: 133-143.

Dag, A., Eisenstein, D., Gazit, S., El-Batsri, R., Degani, C. 1998. Effect of pollenizer distance and selective fruitlet abscission on outcrossing rate and yield in 'Tommy Atkins' mango. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 618-622.

Delph, L., Havens, K. 1998. Pollen competition in flowering plants. En Birkhead, T. R., Møller, A. P. (eds.), *Sperm Competition and Sexual Selection*, pp. 149-173. Academic Press, San Diego.

Dinkel, T., Lunau, K. 2001. How drone flies (*Eristalis tenax* L., Syrphidae, Diptera) use floral guides to locate food sources. *Journal of Insect Physiology* 47: 1111-1118.

Du Toit, A.P., Swart, D.J. 1993. Pollination of mango in the Letsitele Valley during the 1992 flowering season: first report. *Yearbook South African Mango Growers' Association* 13: 129-130.

- El-Habashy, S., Maklad, M.F., Ahmed, E.A.H. 2016. Effect of Self and Cross-Pollination in some local mango cultivars on fruit set and retained fruits. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental* 16: 1776-1783.
- Free, J.B., Williams, I.H. 1976. Insect pollination of *Anacardium occidentale* L., *Mangifera indica* L., *Blighia sapida* Koenig and *Persea americana* Mill. *Tropical Agriculture* 53: 125-139.
- Galán Saúco, V. 2002. Greenhouse cultivation of tropical fruits. *Acta Horticulturae* 575: 727-735.
- Galán-Saúco, V. 2014. Mango, litchi y pitaya. En Hueso, J. J., Cuevas, J. (eds.), *La fruticultura del siglo XXI en España*, Serie Agricultura, pp. 360-367. Cajamar Caja Rural, España.
- Galán-Saúco, V., Galván, D., Hernández Conde, J.C., Navarro, A. 1997. Preliminary studies on fruit-set of mango cultivar Tommy Atkins under greenhouse cultivation in the Canary Islands. *Acta Horticulturae* 455: 530-537.
- Galen, C., Plowright, R.C. 1985. Contrasting movement patterns of nectar-collecting and pollen-collecting bumble bees (*Bombus terrecola*) on fireweed (*Chamaenerion angustifolium*) inflorescences. *Ecological Entomology* 10: 9-17.
- Gilbert, F.S. 1985. Diurnal activity patterns in hoverflies (Diptera, Syrphidae). *Ecological Entomology* 10: 385-392.
- Gilbert, F.S. 1981. Foraging ecology of hoverflies: morphology of the mouthparts in relation to feeding on nectar and pollen in some common urban species. *Ecological Entomology* 6: 245-262.
- Harder, L.D., Barrett, S.C.H. 1996. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. En Lloyd, D. G., Barrett, S. C. H. (eds.), *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*, pp. 140-190. Chapman & Hall, New York.
- Haslett, J.R. 1989. Adult feeding by holometabolous insects: pollen and nectar as complementary nutrient sources for *Rhingia campestris* (Diptera: Syrphidae). *Oecologia* 81: 361-363.
- Hormaza, J.I., Herrero, M. 1992. Pollen selection. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 663-672.
- Huda, A.N., Salmah, M.R.C., Hassan, A.A., Hamdan, A., Razak, M.N.A. 2015. Pollination services of mango flower pollinators. *Journal of insect science (Online)* 15: 113.
- Hurtado Asencio, P. 2013. Estudio del ciclo de vida de sírfidos eristalinos (Diptera, Syrphidae) y bases para su cría artificial. Tesis Doctoral Universidad de Alicante.
- Jiron, L.F., Hedstrom, I. 1985. Pollination ecology of mango (*Mangifera indica* L) (Anacardiaceae) in the neotropic region. *Turrialba* 35: 269-277.
- King, C., Ballantyne, G., Willmer, P.G. 2013. Why flower visitation is a poor proxy for pollination: measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 811-818.
- Klecka, J., Hadrava, J., Biella, P., Akter, A. 2018. Flower visitation by hoverflies (Diptera: Syrphidae) in a temperate plant-pollinator network. *PeerJ* 6: e6025.
- Klomberg, Y., Dywou Kouede, R., Bartoš, M., Mertens, J.E.J., Tropek, R., Fokam, E.B., Janeček, Š. 2019. The role of ultraviolet reflectance and pattern in the pollination system of *Hypoxis camerooniana* (Hypoxidaceae). *AoB PLANTS* 11(5): plz057.
- Lucas-García, R., Rosas-Guerrero, V., Alemán-Figueroa, L., Almazán-Núñez, R.C., Violante-González, J., Kuk-Dzul, J.G. 2021. Spatial proximity of ‘Ataulfo’ to ‘Haden’ cultivar increases mango yield and decreases incidence of nubbins. *Agronomy* 11: 450.

- Lunau, K. 2014. Visual ecology of flies with particular reference to colour vision and colour preferences. *Journal of comparative physiology A* 200 (6): 497–512
- Lunau, K., Ren, Z.-X., Fan, X.-Q., Trunschke, J., Pyke, G.H., Wang, H. 2020. Nectar mimicry: a new phenomenon. *Scientific Reports* 10: 7039.
- Lundgren, J.G. 2009. *Relationships of Natural Enemies and Non-Prey Foods*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Mann, L.K. 1943. Fruit shape of watermelon as affected by placement of pollen on stigma. *Botanical Gazette* 105: 257-262.
- Miñarro Prado, M., García García, D., Martínez Sastre, R. 2018. Impact of insect pollinators in agriculture: importance and management of their biodiversity. *Ecosistemas* 27: 81-90.
- Mulcahy, D.L., Mulcahy, G.B. 1987. The effects of pollen competition. *American Scientist* 75: 44-50.
- Navarro Castillo, J.A. 1994. Introducción de abejorros como polinizadores en cultivos protegidos de Almería. *Boletín del Instituto de Estudios Almerienses. Ciencias* 13: 101-118.
- Ne'eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S.G., Dafni, A. 2010. A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 85: 435-451.
- Osterman, J., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Bosch, J., Howlett, B.G., Inouye, D.W., Jung, C. et al. 2021. Global trends in the number and diversity of managed pollinator species. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 322: 107653.
- Page, M.L., Nicholson, C.C., Brennan, R.M., Britzman, A.T., Greer, J., Hemberger, J., Kahl, H. et al. 2021. A meta-analysis of single visit pollination effectiveness comparing honeybees and other floral visitors. *American Journal of Botany* 108 (11): 2196–2207.
- Pérez, V., Herrero, M., Hormaza, J.I. 2016. Self-fertility and preferential cross-fertilization in mango (*Mangifera indica*). *Scientia Horticulturae* 213: 373-378.
- Ramírez, F., Davenport, T.L. 2016. Mango (*Mangifera indica* L.) pollination: A review. *Scientia Horticulturae* 203: 158-168.
- Reche, J. 1994. *Cultivo intensivo de la sandía*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Rotheray, G.E., Gilbert, F.S. 2011. *The Natural History of Hoverflies*. Forrest Text, Wales, UK.
- Subasinghe-Arachchige, E.C.W., Evans, L.J., Samnegård, U., Rader, R. 2022. Morphological characteristics of pollen from triploid watermelon and its fate on stigmas in a hybrid crop production system. *Scientific Reports* 12: 3222.
- Sung, I.-H., Lin, M.-Y., Chang, C.-H., Cheng, A.-S., Chen, W.-S. 2006. Pollinators and their behaviors on mango flowers in Southern Taiwan. *Formosan Entomologist* 26: 161-170.
- Taha, E.-K., Bayoumi, Y. 2009. The value of honeybees (*Apis mellifera*, L.) as pollinators of summer seed watermelon (*Citrullus lanatus* colothynthoides L.) in Egypt. *Acta Biologica Szegediensis* 53: 33-37.
- Thomson, J.D. 1986. Pollen transport and deposition by Bumble Bees in Erythronium: Influences of floral nectar and bee grooming. *Journal of Ecology* 74: 329-341.
- Usha, U., Srivastava, P. 2018. Foraging reward and foraging behavior of insect visitors on mango flowers during blooming period. *International Journal of Pure and Applied Bioscience* 6: 437-440.

Waser, N.M. 1983. The adaptive nature of floral traits: Ideas and evidence. En Real, L. A. (ed.), *Pollination Biology*, pp. 241-285. Academic Press, Orlando.

Wijesinghe, S.A.E.C., Evans, L.J., Kirkland, L., Rader, R. 2020. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Scientia Horticulturae* 271: 109493.

Wojcik, V. 2021. *Pollinators: Their Evolution, Ecology, Management, and Conservation*. IntechOpen.

Wolf, S., Lensky, Y., Paldi, N. 1999. Genetic variability in flower attractiveness to honeybees (*Apis mellifera* L.) within the genus *Citrullus*. *HortScience* 34: 860-863.

CAPÍTULO X: CONCLUSIONES / CONCLUSIONS



CONCLUSIONES

PRIMERA.- El sírfido *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) es un polinizador eficaz de *Mangifera indica* (L.) y *Citrullus lanatus* (Thunb.), a pesar de los diferentes síndromes de polinización establecidos por estas plantas.

SEGUNDA.- El mango y la sandía presentan características florales entomófilas sin rasgos especializados, lo que favorece la miofilia por sírfidos. Las principales recompensas florales ofrecidas por ambos cultivos son polen y néctar. En mango, el polen se encuentra en pequeñas cantidades en una única antera, y el néctar en un disco nectario apropiado para dípteros. Tanto la flor estaminada como hermafrodita ofrecen ambas recompensas, con diferencias en cantidad y composición de las mismas. Ambos tipos de flores muestran un aumento de secreción de néctar a horas centrales del día y por la tarde, en comparación con la mañana. Además, la flor hermafrodita produce mayor cantidad de néctar que la masculina.

En sandía, las flores pistiladas ofrecen tan solo néctar, a diferencia de las estaminadas que ofrecen polen y néctar. El cultivar, tipo de flor y hora del día tiene un efecto significativo en la cantidad y composición de las recompensas florales ofrecidas al polinizador. La secreción de néctar es superior a horas centrales del día, con un mayor volumen en flores pistiladas triploides. En el caso del polen, la mayor producción por flor corresponde con los cultivares diploides. Las diversas características y recompensas florales de ambos cultivos no promueven la discriminación de los sírfidos hacia un tipo específico de flor, permitiendo por lo tanto el transporte del polen.

TERCERA.- *Eristalinus aeneus* presenta una gran capacidad de adaptación al medio, manteniendo su actividad en un amplio rango de temperatura (18 – 37 °C), intensidad lumínica (8 – 57 klux) y humedad relativa (19 – 89 %), registradas en el cultivo de mango durante el mes de marzo - abril. Igual sucede en el cultivo de sandía, desarrollado en abril – mayo, donde la actividad polinizadora de este sírfido se desarrolla en amplio rango de temperatura (27 – 37 °C), intensidad lumínica (9 – 72 klux) y humedad relativa (29 – 57%). En ambos cultivos, el principal factor ambiental que afecta a su patrón de vuelo es la intensidad lumínica. Esta adaptación asegura la viabilidad de su uso en la polinización de los cultivos protegidos durante la primavera.

CUARTA.- La actividad polinizadora de *E. aeneus* se mantiene durante unas 10 horas al día. Su patrón de vuelo muestra un comportamiento bimodal, con dos picos de actividad,

uno por la mañana y otro por la tarde, en ambos cultivos. Durante el tiempo considerado de actividad, se mantiene en movimiento durante más del 80%, y más del 60% del tiempo forrajeando tanto polen como néctar.

QUINTA.- La interacción planta – polinizador en el cultivo del mango muestra que el sírfido *E. aeneus* presenta una ligera preferencia hacia la flor hermafrodita, a pesar de que las masculinas representan un mayor porcentaje. Esto es debido a su posición en zonas apicales más expuestas de la inflorescencia, de más fácil acceso para el sírfido. El estudio de esta interacción en el cultivo de sandía no mostró preferencias por *E. aeneus*, ni al tipo de flor (pistilada versus estaminada) ni a un cultivar (diploide versus triploide) concreto.

SEXTA.- El polen y el néctar constituyen la base de la alimentación de *E. aeneus* en ambos cultivos. Un aumento de la cantidad de néctar producido por las plantas de mango y sandía supone un incremento en la actividad de los sírfidos. Respecto al polen, se no se observa una disminución del número de veces que se alimenta sobre él, pero sí se aprecia una disminución de la duración de la visita vespertina en el cultivo de sandía.

SÉPTIMA.- Una única suelta de *E. aeneus* muestra una eficacia polinizadora en mango superior a la obtenida con *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758), y similar a la de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) en sandía, ambos himenópteros empleados comúnmente en agricultura protegida.

OCTAVA.- En el cultivo protegido de mango Osteen, una densidad de suelta de entre 30 y 45 individuos/m² de *E. aeneus* ofrece una alta eficacia polinizadora con rendimientos óptimos del cultivo. Esta densidad de suelta aumenta significativamente el número de frutos por árbol y el peso de los mismos en comparación con la no introducción de polinizadores, o con el uso de abejorros.

NOVENA.- En el cultivo protegido de sandía con cultivares diploides y triploides asociados, la densidad de suelta comprendida entre 30 y 45 individuos/m² de *E. aeneus* proporciona un rendimiento óptimo del cultivo. Ambas densidades favorecen la producción de más frutos de mejor calidad, en comparación con menores densidades de suelta.

DÉCIMA.- Tras comprobar la eficacia polinizadora de *E. aeneus*, se recomienda el uso de este sírfido como polinizador manejado de los cultivos protegidos de mango y sandía.

CONCLUSIONS

FIRST.- The hoverfly *Eristalinus aeneus* (Scopoli, 1763) is an effective pollinator of *Mangifera indica* (L.) and *Citrullus lanatus* (Thunb.), despite the different pollination syndromes established by these plants.

SECOND.- Mango and watermelon present entomophilous floral characteristics without specialized features, which favors myophily by hoverflies. The main floral rewards offered by both crops are pollen and nectar. In mango, pollen is found in small quantities in a single anther, and nectar in a nectary disk suitable for dipterans. Both staminate and hermaphrodite flowers offer both rewards, with differences in quantity and composition of the rewards. Both types of flowers show increased nectar secretion in the middle of the day and in the evening compared to the morning. In addition, the hermaphrodite flower produces more nectar than the male flower.

In watermelon, pistillate flowers offer only nectar, as opposed to staminate flowers that offer pollen and nectar. Cultivar, flower type and time of day have a significant effect on the amount and composition of floral rewards offered to the pollinator. Nectar secretion is higher at central hours of the day, with a greater volume in triploid pistillate flowers. In the case of pollen, the highest production per flower corresponds to diploid cultivars. The different characteristics and floral rewards of both cultivars do not promote the discrimination of the syrphids towards a specific type of flower, thus allowing the transport of pollen.

THIRD.- *Eristalinus aeneus* presents a great capacity to adapt to the environment, maintaining its activity in a wide range of temperature (18 - 37 °C), light intensity (8 - 57 klux) and relative humidity (19 - 89 %), registered in the mango crop during the month of March - April. The same happens in the watermelon crop, developed in April - May, where the pollinating activity of this syrphid develops in a wide range of temperature (27 - 37 °C), light intensity (9 - 72 klux) and relative humidity (29 - 57%). In both crops, the main environmental factor affecting its flight pattern is light intensity. This adaptation ensures the viability of their use in the pollination of protected crops during the spring.

FOURTH.- The flight activity of *E. aeneus* is maintained for about 10 hours a day. Its flight pattern shows a bimodal behavior, with two peaks of activity, one in the morning and the other in the afternoon, in both crops. During the time considered active, it remains

in motion for more than 80% of the time, and more than 60% of the time foraging both pollen and nectar.

FIFTH.- The plant-pollinator interaction in the mango crop shows that the hoverfly *E. aeneus* shows a slight preference for the hermaphrodite flower, despite the fact that the male flowers represent a higher percentage. This is due to their position in more exposed apical zones of the inflorescence, which are more easily accessible to the syrphid. The study of this interaction in the watermelon crop showed no preference for *E. aeneus*, neither to the type of flower (pistillate versus staminate) nor to a specific cultivar (diploid versus triploid).

SIXTH.- Pollen and nectar constitute the basis of the diet of *E. aeneus* in both cultivars. An increase in the amount of nectar produced by mango and watermelon plants means an increase in the activity of the syrphids. With respect to pollen, no decrease in the number of times they feed on it was observed, but a decrease in the duration of the evening visit was observed in the watermelon crop.

SEVENTH.- A single release of *E. aeneus* shows a higher pollination efficacy in mango than that obtained with *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758), and similar to that of *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) in watermelon, both hymenopterans commonly used in protected agriculture.

EIGHTH.- In the protected crop of Osteen mango, a release density of between 30 and 45 individuals/m² of *E. aeneus* offers a high pollination efficiency with optimal crop yields. This density of release significantly increases the number of fruits per tree and the weight of the same in comparison with the no introduction of pollinators, or with the use of bumblebees.

NINTH.- In protected watermelon cultivation with associated diploid and triploid cultivars, a release density between 30 and 45 individuals/m² of *E. aeneus* provides optimum crop yield. Both densities favor the production of more fruits of better quality, compared to lower release densities.

TENTH.- After verifying the pollination efficacy of *E. aeneus*, the use of this hoverfly as a managed pollinator of protected mango and watermelon crops is recommended.

