

## Estimación del servicio de polinización en un cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) mediante la cuantificación de flores disparadas

JOANA P. HAEDO<sup>1,2,5,✉</sup>; SOFIA GRAFFIGNA<sup>1,2,5</sup>; LUCÍA C. MARTÍNEZ<sup>2,3,5</sup>; JUAN P. TORRETTA<sup>4,5</sup>  
& HUGO J. MARRERO<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS), CONICET. <sup>2</sup> Laboratorio de Interacciones Bióticas en Agroecosistemas (LIBA). <sup>3</sup> Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. <sup>4</sup> Cátedra de Botánica General, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. <sup>5</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

**RESUMEN.** La polinización biótica afecta de forma directa al rendimiento de la mayoría de especies vegetales cultivadas. Por eso es importante monitorear el estado del servicio de polinización en un lote; sin embargo, es raro que esto se lleve a cabo. A la hora de realizar mediciones, ciertos mecanismos de polinización —como el mecanismo explosivo— le permitirían al productor estimar el rendimiento de un cultivo de una manera rápida y eficiente. El objetivo del presente estudio fue poner a prueba una metodología de conteo de flores disparadas para ser utilizada como estimador cuantitativo del servicio de polinización en cultivos con mecanismo explosivo de polinización. Para ello usamos 16 lotes de producción de alfalfa (*Medicago sativa*) en ocho sitios del Valle Bonaerense del Río Colorado, donde realizamos experimentos de polinización y cuantificamos la proporción de flores disparadas (visitadas) por inflorescencia y la producción de frutos. Los resultados mostraron a) que las flores de alfalfa no disparadas por un polinizador tienen muy baja probabilidad de formar frutos, b) que una sola visita efectiva es suficiente para la fructificación, y c) que sucesivas visitas no aumentan la probabilidad de formación de frutos. Asimismo, demostramos que la proporción de flores disparadas en un lote se relaciona positiva y significativamente con la producción de frutos. Nuestros resultados evidencian que cuantificar las flores disparadas puede ser una herramienta eficiente para estimar la cantidad de servicio de polinización en un cultivo cuyas flores poseen un mecanismo explosivo de polinización. Aunque esta metodología no le permitirá al productor saber cuáles son las causas de la deficiencia en la fructificación, esperamos que sea el primer paso en la detección de problemas, sin dejar de lado los estudios a largo plazo, que permitirán mejorar el servicio de polinización de una forma más efectiva.

[Palabras clave: polinización biótica, cultivos, *Medicago sativa*, producción de frutos]

**ABSTRACT.** Alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollination service estimation by tripped flowers quantification. Biotic pollination directly affects yield of most of crop species. Therefore, monitoring the pollination service in a crop field is very important, although it rarely occurs. Certain pollination mechanisms, such as the explosive mechanism of flowers, would allow farmers to estimate the crop yield quickly and efficiently. The objective of this study is to evaluate a methodology for estimating the pollination service in crops with explosive pollination mechanism through the quantification of tripped flowers. For this, we used 16 alfalfa (*Medicago sativa*) lots in eight fields located in the Valle Bonaerense del Río Colorado, where we conducted pollination experiments and assessed the proportion of tripped flowers (visited) per inflorescence and the plant reproductive success (estimated as fruit set). Our results showed that a) in alfalfa, non-tripped flowers have a very low probability of becoming fruit, b) a single effective visit is sufficient for fructification, and c) successive visits do not increment the probability of fruit formation. On the other hand, we demonstrated that the proportion of tripped flowers is positively related to fruit set. Our results evidence that the assessment of tripped flowers can be an efficient tool to quantify the pollination service in a crop with an explosive mechanism. Although this methodology does not explain the causes of fructification deficiency, this tool may become the first step in crop problems detection, without neglecting the long-term studies that will improve pollination service in an effective way.

[Keywords: biotic pollination, crops, *Medicago sativa*, fruit set]

## INTRODUCCIÓN

La polinización biótica afecta directamente el rendimiento y la calidad de casi 75% de las especies vegetales cultivadas a nivel global (Klein et al. 2007). Gallai et al. (2009) estimaron que el valor del servicio de polinización a nivel mundial representaba unos 153000 millones de euros en 2005, y la dependencia económica de los países por la polinización biótica continúa en alza (Lautenbach et al. 2012; Aizen et al. 2019). Sin embargo, a pesar de su importancia, es raro que se monitoree el estado del servicio de polinización a nivel de lote (Breeze et al. 2011; Garibaldi et al. 2020). En la actualidad existen protocolos para medir la abundancia y la diversidad de polinizadores, como también las características del hábitat que necesitan (Vaissière et al. 2011; Garibaldi et al. 2020). Dado que por lo general el monitoreo del estado del servicio de polinización se realiza mediante el análisis de la producción de frutos o semillas (Garibaldi et al. 2013), esto no permite detectar de manera temprana posibles problemas en la polinización. Para algunos tipos de cultivos (i.e., aquellos que necesitan la acción de un polinizador), una manera de resolver este problema, sería desarrollar metodologías que permitieran detectar las 'huellas' que los polinizadores dejan sobre las flores. Esto le permitiría al productor obtener estimaciones de polinización de una forma rápida y fácil.

Entre los cultivos cuya polinización se puede estimar a partir de evidencias de presencia de polinizadores se encontrarían aquellos que tienen un mecanismo de polinización explosivo, que consiste en la liberación del polen mediante un movimiento enérgico de las anteras y el estigma (Aluri and Reddi 1995). Las especies cuyas flores poseen dicho mecanismo, como algunas leguminosas papilionáceas (e.g., *Cytisus scoparius*, *Spartium* spp., *Medicago sativa*, etc.), tienen los ciclos fértiles (androceo y gineceo) encerrados dentro de la quilla, quedando expuestos sólo cuando un polinizador hace presión sobre las alas (dos pétalos laterales) y disparan la flor (Alemán et al. 2014). De esta forma, las anteras y el estigma entran en contacto con el cuerpo del polinizador, lo que favorece la polinización biótica. Luego de este proceso, la flor no vuelve a su estado original y el mecanismo queda desactivado, aunque hay excepciones (Galloni and Cristofolini 2003). Por lo tanto, contar el número de flores disparadas en un lote de un cultivo con mecanismo explosivo puede ser una herramienta útil para cuantificar el

servicio de polinización. Además, al medirse *in situ* y de forma rápida, el conteo de flores disparadas permitiría obtener datos en diferentes momentos o sectores de un lote; es decir, a distintas distancias del borde de cultivo o de colmenas de abejas. Esto aportaría información espacial y temporal explícita. Aunque se sabe que el número de flores disparadas en especies con mecanismo explosivo se relaciona de manera positiva con la abundancia y la frecuencia de visitas de los polinizadores (Parker 1997; Suzuki 2003; Morales et al. 2014; Gavini and Farji-Brener 2015; Chen and Zuo 2018), aún no se lo utilizó como método para medir el servicio de polinización en un cultivo.

La presencia de una flor disparada es evidencia de que fue visitada por lo menos una vez, pero no refleja el número de visitas que esa flor recibió. La cantidad de visitas que una flor recibe es relevante, ya que en general, el incremento de la frecuencia de visitas sobre una flor aumenta su éxito reproductivo femenino (Morris et al. 2010). Sin embargo, en flores con mecanismo explosivo se observó que la cantidad de polen depositado luego de una visita suele exceder el mínimo necesario para la fertilización de todos los óvulos de la flor (Figuroa-Fleming and Etcheverry 2017). En parte, esto se debe a que las flores con mecanismo explosivo suelen tener una baja cantidad de óvulos en relación con la cantidad de polen que producen (Figuroa-Fleming and Etcheverry 2017). Además, se vio que los polinizadores evitan visitar flores en las que el mecanismo explosivo ya fue desactivado (i.e., flores ya visitadas antes); es posible que esto se deba al cambio en la disposición de los pétalos (Suzuki 2003; Alemán et al. 2014). Por lo tanto, en flores con mecanismo explosivo, una sola visita podría ser suficiente para que la flor alcance su éxito reproductivo femenino máximo.

La limitación en la producción de frutos también puede deberse a una limitación por recursos (Liss et al. 2013). En este caso, cuantificar las flores disparadas puede no ser un buen estimador de la fructificación. No obstante, en la actualidad, la agricultura intensiva ha aliviado la limitación de recursos de los cultivos al aportar insumos como fertilizantes o riego, y el flujo de polen se ha convertido en la limitación más importante del rendimiento (Melathopoulos et al. 2015). En consecuencia, si el manejo agrícola es eficiente en cuanto al aporte de recursos para el cultivo, la cuantificación de flores disparadas por sí

sola puede ser un método efectivo a la hora de evaluar el aspecto cuantitativo del servicio de polinización. La polinización óptima en cada lote se define como el éxito reproductivo máximo obtenido por polinización cruzada dada la disponibilidad real de recursos (Vaissière et al. 2011). Conocer la polinización óptima permitiría saber la cantidad máxima de frutos que se pueden formar en cada lote, y evaluar si el método de conteo de flores disparadas es eficiente como estimador del servicio de polinización o si la disponibilidad de recursos del lote tiene un efecto importante en la producción de frutos.

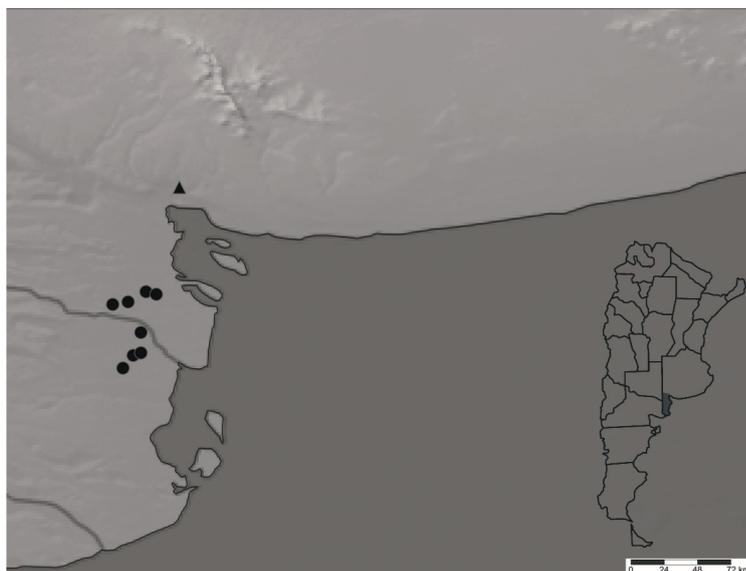
El objetivo del presente estudio es evaluar la metodología de conteo de flores disparadas como estimador del servicio de polinización en cultivos con mecanismo explosivo de polinización. Para ello utilizamos como caso de estudio lotes de producción de alfalfa (*Medicago sativa*), una especie que depende de la visita de un polinizador con el sucesivo disparo de la flor para que la polinización ocurra (Linsley 1946; Bohart 1958; Batra 1976; Tasei et al. 1978; Viands et al. 1988; Watmough 1999; Cane 2002; Wang et al. 2012). Pusimos a prueba una hipótesis que postula que la cantidad de flores disparadas es un buen estimador del estado cuantitativo del servicio de polinización de un lote. Predecimos que 1) la probabilidad de formar frutos es mayor en flores disparadas que en flores no disparadas, 2) la probabilidad de formar frutos no aumenta con las sucesivas visitas, y 3) la cantidad de flores disparadas se relaciona positivamente con la producción de frutos bajo polinización natural (i.e., polinización libre).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Especie y sitios de estudio*

La alfalfa es un cultivo nativo de Asia, introducido en diferentes partes del mundo como forraje para ganado. Posee pequeñas flores dispuestas en racimos, formando una inflorescencia simple (Rodríguez and Spada 2007). Las flores en antesis disponen de sus pétalos próximos entre sí, con los ciclos fértiles encerrados por la quilla, y poseen un mecanismo de polinización explosiva (Bohart 1957), lo que hace a la especie muy dependiente de los polinizadores.

Trabajamos en 8 campos de alfalfa ubicados en el Valle Bonaerense del Río Colorado, en las localidades de Hilario Ascasubi, Pedro Luro, Juan A. Pradere y Villalonga, y en una parcela experimental urbana perteneciente a la semillera Guasch SRL, en Bahía Blanca (Figura 1). En cada uno de los campos (excepto en la parcela experimental) se tomaron dos lotes separados por al menos 300 m (en total, 16 lotes). Cuatro campos tenían un manejo de la polinización con *Megachile rotundata* (Pitts-Singer and Cane 2011), teniendo en promedio 3 domicilios/ha, con estructuras de 3x3x2 m que contienen tableros de madera con cavidades que las hembras de *M. rotundata* utilizan como sitios de nidificación, totalizando aproximadamente 45000 celdillas (Material Suplementario- Figura S1). Los restantes campos poseían ~3 colmenas de *Apis mellifera*/ha. La parcela experimental en Bahía Blanca no tenía ningún manejo de polinizadores. Además de los polinizadores



**Figura 1.** Mapa detallado del área de estudio construido con SimpleMapppr (Shorthouse 2010). Los círculos corresponden a los ocho campos no urbanos y el triángulo a la parcela experimental ubicada en Bahía Blanca. En el extremo inferior izquierdo se muestra el mapa de la República Argentina con el área de estudio coloreada en gris.

**Figure 1.** Detailed map of the study area performed with SimpleMapppr (Shorthouse 2010). Circles correspond to the eight study fields and the triangle to the experimental plot located in Bahía Blanca. The lower left corner shows the map of the Argentine Republic with the study site colored in gray.

manejados, en la mayor parte de los lotes se observaron distintas especies de abejas nativas visitando el cultivo (Haedo et al. 2022).

#### *Cantidad de visitas simuladas y producción de frutos*

Para poner a prueba las predicciones número 1 (la probabilidad de formar frutos es mayor en flores disparadas que en flores no disparadas) y 2 (la probabilidad de formar frutos no aumenta con las sucesivas visitas) realizamos un experimento de polinización en 9 plantas de alfalfa en la parcela experimental en Bahía Blanca. En cada individuo seleccionamos 5 inflorescencias donde removimos las flores ya disparadas y los botones florales, dejando sólo dos flores próximas a la antesis en cada una. Luego realizamos los siguientes tratamientos de polinización en cada par de flores (18 flores por tratamiento). T0: la flor no fue tratada, simulando la ausencia de visitas; T1: disparamos la flor mediante un toque y la polinizamos manualmente con polen de otro individuo, simulando una única visita; T2, T3 y T4: en estos tres tratamientos variamos el número de toques (dos, tres y cuatro toques, respectivamente), simulando sucesivas visitas de polinizadores. Los toques se realizaron con un cepillo odontológico de 2 mm de diámetro (ver Fung and Thomson [2017] para un enfoque similar). En T2, T3 y T4, el cepillo se volvió a cargar con polen exógamo para cada toque. Debido al mecanismo explosivo de las flores de alfalfa es posible que polen propio haya alcanzado el estigma. Luego de realizar los tratamientos, todos los individuos se cubrieron con una jaula de exclusión que cubría toda la planta y estaba cerrada con malla de tul de 1 mm, evitando la visita de polinizadores a las flores tratadas, pero permitiendo la entrada de sol, viento y agua (Material Suplementario- Figura S2). Una vez que se formaron los frutos, los recolectamos y se determinó la producción de frutos (#frutos formados/#flores) para cada tratamiento.

#### *Flores disparadas y producción de frutos*

Para poner a prueba la predicción número 3 (la cantidad de flores disparadas se relaciona positivamente con la producción de frutos mediada por polinización natural), en cada uno de los 16 lotes no urbanos marcamos dos puntos desde el borde hacia el centro (0 y 50 m, respectivamente). Los bordes de cultivo consistían en ambientes seminaturales compuestos en su mayor parte por plantas herbáceas exóticas (e.g., *Diploaxis tenuifolia*,

*Carduus nutans*, *Hirschfeldia incana* y *Centaurea solstitialis*) y algunas especies vegetales nativas (e.g., *Hoffmannseggia glauca* y *Lycium chilense*).

Primero, estimamos la polinización óptima (i.e., la producción de frutos en ausencia de una limitación cuantitativa y cualitativa de polen) para tener una medida de la cantidad máxima de frutos que podían formarse en cada lote, dada la disponibilidad de recursos en el momento del estudio. Para ello, marcamos 20 individuos (10 en cada punto) y seleccionamos una inflorescencia por individuo, de la que removimos flores ya disparadas y botones florales, dejando cuatro flores próximas a la antesis. Una vez en antesis, realizamos un tratamiento de polinización manual cruzada (como fue explicado anteriormente, T1). Al finalizar los tratamientos cubrimos a cada individuo con una bolsa de tul a fin de evitar posteriores visitas de polinizadores. Luego, una vez formados, colectamos y cuantificamos los frutos en cada una de las inflorescencias marcadas y determinamos la producción de frutos en cada individuo para calcular la polinización óptima de cada lote.

Para estimar la cantidad de flores disparadas realizamos muestreos semanales durante la fenología de floración del cultivo (entre diciembre de 2018 y febrero de 2019). En cada muestreo seleccionamos 10 inflorescencias al azar en cada punto (0 y 50 m) y cuantificamos la proporción de flores disparadas (#flores disparadas/#total de flores por inflorescencia).

Por último, para calcular la producción de frutos formados por polinización natural (polinización libre) seleccionamos 10 individuos en los mismos dos puntos (0 y 50 m), a los cuales les marcamos una inflorescencia con una etiqueta rotulada. A cada inflorescencia le cortamos las flores disparadas y la yema apical (para evitar el desarrollo de la inflorescencia) y contamos el número de botones florales (en distintos estadios de desarrollo). Luego, colectamos y cuantificamos los frutos formados en cada una de las inflorescencias marcadas y determinamos la producción de frutos proveniente de la polinización natural.

#### *Análisis estadístico*

Cantidad de visitas simuladas y producción de frutos. Para evaluar las predicciones número 1 y 2 construimos un modelo generalizado

lineal mixto (GLMM por sus siglas en inglés) con distribución binomial, en el que la variable de respuesta fue la producción de frutos, el individuo se utilizó como factor aleatorio y el tratamiento (T0, T1, T2, T3 y T4) como factor fijo. El modelo se construyó utilizando la función `glmer` del paquete `lme4` en programa estadístico R (R Development Core Team 2020). Luego, se realizó una prueba de Tukey de comparaciones múltiples para evaluar las diferencias entre tratamientos, mediante la función `glht` del paquete `multcomp` (R Development Core Team 2020).

**Flores disparadas y producción de frutos.** Realizamos un GLMM para estimar la relación entre flores disparadas y la producción de frutos utilizando la función `glmer` del paquete `lme4`, con distribución binomial (R Development Core Team 2020), en el que la variable respuesta fue la producción de frutos (definida como un vector de dos columnas [i.e., número de frutos formados, número de frutos no formados]). El campo y los lotes anidados a cada campo fueron las variables aleatorias, mientras que las variables fijas fueron la proporción de flores disparadas promedio, la polinización óptima promedio para cada lote y las distancias dentro del lote (0 y 50 m). A pesar de que la distancia no es una variable de interés para la hipótesis que planteamos, creemos que es necesario incorporarla al modelo ya que puede ser una fuente de variación importante.

## RESULTADOS

### *Cantidad de visitas simuladas y producción de frutos*

La proporción (en tanto por uno) de flores que dieron fruto fue, en promedio, de sólo

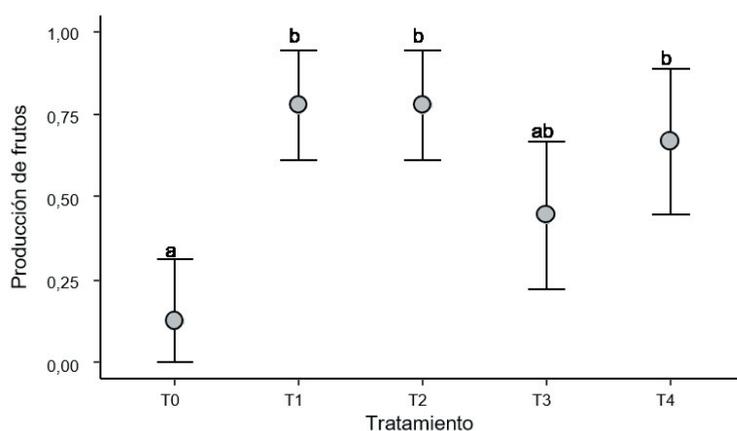
0.12±0.85 (±error estándar) de las flores que estuvieron bajo el tratamiento de exclusión (T0), siendo significativamente menor que la proporción de frutos formados en los tratamientos T1 (0.78±0.10; P=0.0024), T2 (0.78±0.10; P=0.0024) y T4 (0.67±0.11; P=0.0105). Las diferencias no fueron significativas entre T0 y T3 (0.44±0.12; P=0.1811) ni entre los tratamientos de polinización manual (T2, T3 y T4) (Figura 2).

### *Flores disparadas y producción de frutos*

Entre todos los lotes, encontramos en promedio una proporción de 0.15±0.01 flores (n=1033) disparadas por inflorescencia, y el valor máximo fue 0.72±0.04 (lote 2, n=73; Material Suplementario- Tabla S1). Una inflorescencia promedio tuvo 9.44±0.16 flores en anthesis (disponibles para ser disparadas) (Material Suplementario-Tabla S1).

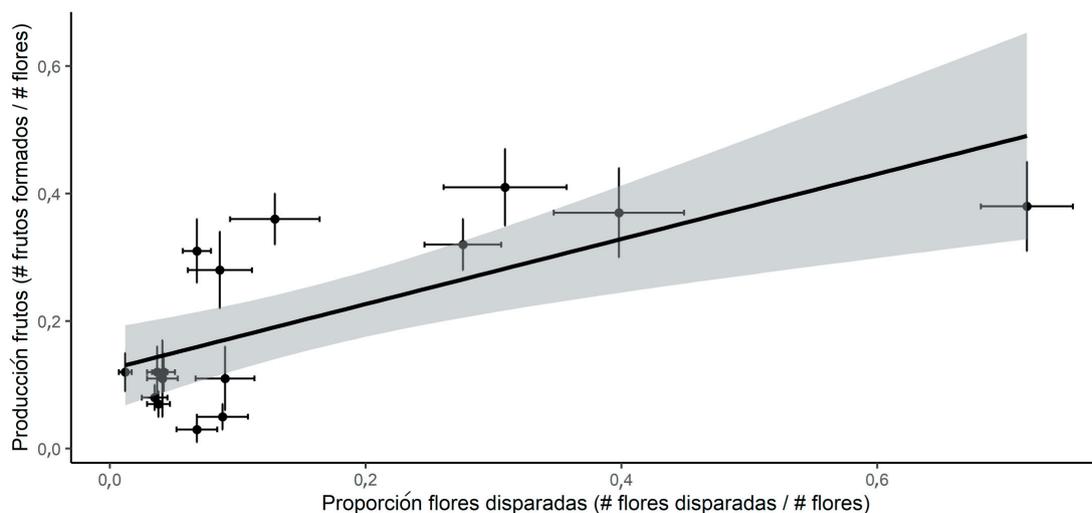
En cuanto a la polinización óptima, observamos diferencias significativas entre lotes (P<0.05; ver análisis estadístico y Material Suplementario-Tabla S2). El lote con mayor polinización óptima tuvo una media de 0.80±0.53 de formación de frutos, mientras que el lote con menor polinización óptima tuvo una producción de frutos promedio de 0.31±0.82 (Material Suplementario-Tabla S2).

El GLMM mostró una relación positiva y estadísticamente significativa entre la proporción de flores disparadas y la cantidad de frutos formados por polinización natural en un lote de alfalfa (z=4.39, error estándar=0.66, P<0.001) (Figura 3). Por otro lado, la incorporación de la polinización óptima al modelo no tuvo un efecto significativo sobre la producción de frutos (z=-1.19, error estándar=0.66, P=0.24; Material



**Figura 2.** Producción de frutos de los distintos tratamientos de polinización (T0, T1, T2, T3 y T4). Los puntos grises corresponden a la producción de frutos promedio para cada tratamiento y las barras a los intervalos de confianza. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre las medias (P<0.05) evaluadas mediante la prueba Tukey.

**Figure 2.** Fruit set of the pollination treatments (T0, T1, T2, T3 y T4). Grey points correspond to average fruit set and the bars to the confidence intervals. Different letters show significant differences among the means (P<0.05) evaluated by the Tukey test.



**Figura 3.** Relación entre la proporción de flores disparadas (promedio $\pm$ E.E.) y la producción de frutos (promedio $\pm$ E.E.). Los puntos corresponden al valor promedio para cada lote; las barras verticales, al error estándar de la producción de frutos, y las barras horizontales, al error estándar de la proporción de flores disparadas. La línea negra muestra la relación entre ambas variables y el área gris es el intervalo de confianza estimado por el GLMM.

**Figure 3.** Relationship between the proportion of tripped flowers (average $\pm$ S.E.) and the fruit set (average $\pm$ S.E.). The points are the mean values for each lot, vertical error bars correspond to the standard error of the fruit set and horizontal error bars are the standard error of the proportion of tripped flowers. The black line shows the relationship between the variables and grey area is the confidence interval estimated by the GLMM.

Suplementario-Tabla S3). Por último, hubo diferencias significativas en la producción de frutos entre los 0 y 50 m, siendo mayor en el borde del cultivo ( $z=-2.06$ , error estándar=0.08,  $P=0.04$ ; Material Suplementario-Tabla S3).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la cuantificación de flores disparadas es un buen estimador del estado del servicio de polinización en un cultivo cuyas flores poseen un mecanismo explosivo de polinización como la alfalfa. En nuestro estudio, la probabilidad de formar frutos luego de una visita es seis veces mayor que los que se forman en ausencia de visitas, y no aumenta con sucesivas visitas. Asimismo, la cantidad de flores disparadas por los polinizadores en un lote se relaciona positivamente con la tasa de fructificación. Por último, la polinización óptima no aporta información extra al modelo estadístico, aumentando así la efectividad de la metodología que proponemos en este estudio.

### *Cantidad de visitas simuladas y producción de frutos*

El presente trabajo suma una nueva evidencia a la idea de que las flores de las especies con mecanismo de polinización

explosiva sólo necesitan una visita para ser polinizadas efectivamente (Arroyo 1981; López et al. 1999; Galloni and Cristofolini 2003; Figueroa-Fleming and Etcheverry 2017). Las flores no visitadas tuvieron una probabilidad muy baja de formar frutos; esto indica que la autopolinización autónoma ocurre a una frecuencia muy baja, como ya fue reportado para otras especies de leguminosas con este mecanismo (Susuki 2003; Galloni and Cristofolini 2003; pero ver Alemán et al. 2014), incluso para la alfalfa, en la que la proporción de frutos formados por polinización autónoma fue menor a 0.05 (Viands et al. 1988; Chen and Zuo 2018; Haedo et al. 2022). Por otro lado, la probabilidad de fructificar de una flor que fue visitada una vez no difiere de aquellas flores visitadas 2, 3 ó 4 veces. Aunque en este estudio no cuantificamos la cantidad de polen depositado sobre los estigmas luego de cada visita, es probable que en la primera visita se haya depositado todo el polen necesario para que los óvulos fueran fertilizados (Figueroa-Fleming and Etcheverry 2017). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en nuestro estudio las visitas fueron simuladas y que, en condiciones naturales, la cantidad de polen depositado luego de una visita puede variar entre especies de polinizadores (Santa-Martínez et al. 2021). Los resultados que obtuvimos indican que sería factible estimar el aspecto cuantitativo del servicio

de polinización mediante el conteo de flores disparadas, ya que la producción de frutos no se vería afectada por el número de visitas que la flor tuvo luego de ser disparada.

#### *Flores disparadas y producción de frutos*

Nuestros resultados muestran que la cuantificación de flores disparadas permite conocer cuál es el estado cuantitativo del servicio de polinización de un cultivo con mecanismo explosivo. Aunque analizamos un cultivo de alfalfa, consideramos que esta estimación sería extrapolable a cualquier cultivo con mecanismo explosivo que sea muy dependiente de los polinizadores (tanto para activar el mecanismo floral como para transportar el polen compatible).

En nuestro estudio, la polinización óptima no tuvo un efecto significativo sobre la producción de frutos, mientras que la cantidad de flores disparadas explicó de forma eficiente la probabilidad de fructificación. La polinización óptima da idea de la cantidad máxima de frutos que se pueden formar, por lo que si un lote posee una polinización óptima muy baja, es esperable que la cantidad de frutos formados por polinización natural también lo sea (Vaissière et al. 2011). Esta deficiencia en la polinización puede no deberse al servicio de los polinizadores, sino a factores ambientales o a problemas de manejo (e.g., pH del suelo [Boreux et al. 2013]; ataque de patógenos o insectos plaga [Bos et al. 2007]). Aunque la ausencia de relación entre polinización óptima y la producción de frutos puede ser un resultado particular de nuestro estudio, se ha demostrado que para cultivos muy dependientes de los polinizadores, la disponibilidad de recursos tiene un efecto mucho menor que la polinización biótica sobre el rendimiento (Groeneveld et al. 2010; Boreux et al. 2013). Sin embargo, la influencia de la disponibilidad de recursos puede variar e —independientemente de nuestros resultados— consideramos que la medición de la polinización óptima es necesaria a la hora de evaluar el servicio de polinización de un cultivo. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la estimación de producción de frutos dentro de un lote puede variar según el sector del lote desde donde se realizó la estimación (i.e., cerca del borde o alejado del mismo). Por lo tanto, aconsejamos que cuando se quiera utilizar la metodología que proponemos, la cuantificación de flores abiertas se realice en más de un punto dentro del lote.

Aunque la sólo cuantificación de las flores disparadas no nos permitirá saber las causas en la deficiencia de la producción de frutos, en plantas con mecanismo explosivo está relacionada directamente con la cantidad de flores visitadas de manera eficiente por los polinizadores (Parker 1997; Suzuki 2003; Chen and Zuo 2018). Por lo tanto, una baja cantidad de flores disparadas por lote podría ser consecuencia directa de una baja abundancia o diversidad de polinizadores silvestres (Garibaldi et al. 2013; Dainese et al. 2019) o de un mal manejo de polinizadores introducidos (e.g., cantidad y disposición en las colmenas [Moschetti et al. 2007]).

Diversas razones explican la disminución en la abundancia o la diversidad de polinizadores silvestres en agroecosistemas. Entre estas razones figuran una reducción en la cantidad y la calidad del ambiente natural disponible para alimentarse y nidificar (Kennedy et al. 2013; Hass et al. 2018; Lázaro and Alomar 2019) o bien el uso excesivo de insecticidas y herbicidas (Brittain et al. 2010; Stanley 2015; Graffigna et al. 2021), que puede afectar la supervivencia de los polinizadores silvestres y los manejados. Por último, hay que tener en cuenta que usar polinizadores manejados puede tener un efecto negativo sobre la abundancia de los polinizadores silvestres (Fürst et al. 2014; Goulson 2003, 2010). Por lo tanto, un incremento en la abundancia de los polinizadores manejados no siempre dará como resultado una mejora en el servicio de polinización. Más aun, los polinizadores manejados no siempre son polinizadores eficientes de los cultivos (Garibaldi et al. 2013). Por ejemplo, para la alfalfa, Haedo et al. (2022) observaron que una alta abundancia de *A. mellifera* en lotes manejados con *M. rotundata* tiene un efecto negativo sobre el servicio de polinización del cultivo. Saber cuáles son las necesidades y problemas específicos de cada cultivo requerirá estudios específicos sobre el lote y la ejecución de estrategias de manejo que permitan mejorar el servicio de polinización (Garibaldi et al. 2014).

Consideramos que esta herramienta puede ser el primer paso estimar el aspecto cuantitativo del servicio de polinización de un cultivo con mecanismo explosivo. Conociendo las necesidades del productor, creemos que una evaluación rápida del estado del servicio de polinización puede ser muy útil a la hora de tomar decisiones sobre el destino de un lote a corto plazo, sin dejar de lado estudios a largo plazo que permitirán mejorar nuestro

conocimiento sobre la polinización y tomar decisiones que mejoren su efectividad.

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos a los productores de los campos por permitirnos el ingreso a los lotes de estudio como también a G. Rodríguez y J.P. Renzi, por el apoyo logístico brindado. También agradecemos

los comentarios y sugerencias de Angela Etcheverry, Raquel Benavides, Natalia Pérez Harguindeguy y dos revisores anónimos que ayudaron a mejorar las versiones preliminares del manuscrito. Este estudio fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica: PICT 2015-2523 y PICT 2017-3336.

## REFERENCIAS

- Aizen, M. A., S. Aguiar, J. C. Biesmeijer, L. A. Garibaldi, D. W. Inouye, C. Jung, D. J. Martins, R. Medel, C. L. Morales, H. Ngo, A. Pauw, R. J. Paxton, A. Sáez, and C. L. Seymour. 2019. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology* 25(10): 3516-3527. <https://doi.org/10.1111/gcb.14736>.
- Alemán, M., T. Figueroa-Fleming, A. Etcheverry, S. Sühling, and P. Ortega-Baes. 2014. The explosive pollination mechanism in Papilionoideae (Leguminosae): an analysis with three *Desmodium* species. *Plant Systematics and Evolution* 300(1):177-186. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0869-8>.
- Aluri, R. J., and C. Subba Reddi. 1995. Explosive pollen release and pollination in flowering plants. *Proceedings - Indian National Science Academy Part B* 61:323-323.
- Arroyo, M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. Pp. 723-769 *en* R. M. Polhill and P. H. Raven (eds.). *Advances in legume systematics, part 2*. The Royal Botanical Gardens, Kew, London, United Kingdom.
- Batra, S. W. T. 1976. Comparative efficiency of alfalfa pollination by *Nomia melanderi*, *Megachile rotundata*, *Anthidium florentinum* and *Pithitis smaragdula* (Hymenoptera: Apoidea). *J Kans Entomol Soc* 49:18-22.
- Breeze, T. D., A. P. Bailey, K. G. Balcombe, and S.G. Potts. 2011. Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems and Environment* 142(3-4):137-143. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.03.020>.
- Brittain, C., R. Bommarco, M. Vighi, S. Barmaz, J. Settele, and S. G. Potts. 2010. The impact of an insecticide on insect flower visitation and pollination in an agricultural landscape. *Agricultural and Forest Entomology* 12(3):259-266. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2010.00485.x>.
- Bohart, G. E. 1957. Pollination of alfalfa and red clover. *Annual Review of Entomology* 2(1):355-380. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.02.010157.002035>.
- Bohart, G. E. 1958. Alfalfa pollinators with special reference to species other than honey bees. *Proc 10th Internatl Congr* 4:929-937.
- Boreux, V., C. G. Kushalappa, P. Vaast, and J. Ghazoul. 2013. Interactive effects among ecosystem services and management practices on crop production: pollination in coffee agroforestry systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(21):8387-8392. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210590110>.
- Bos, M. M., I. Steffan-Dewenter, and T. Tschamtkke. 2007. Shade tree management affects fruit abortion, insect pests and pathogens of cacao. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 120:201-205. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.09.004>.
- Cane, J. H. 2002. Pollinating bees (Hymenoptera: Apiformes) of U.S. alfalfa compared for rates of pod and seed set. *J Econ Entomol* 95:22-27. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.22>.
- Chen, M., and X. A. Zuo. 2018. Pollen limitation and resource limitation affect the reproductive success of *Medicago sativa* L. *BMC Ecology* 18(1):28. <https://doi.org/10.1186/s12898-018-0184-x>.
- Dainese, M., E. A. Martin, M. A. Aizen, M. Albrecht, I. Bartomeus, et al. 2019. A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production. *Science Advances* 5(10):eaax012. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0121>.
- Figueroa-Fleming, T., and F. T. Etcheverry. 2017. Comparing the efficiency of pollination mechanisms in Papilionoideae. *Arthropod-Plant Interactions* 11:273-283. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9515-7>.
- Fung, H. F., and J. D. Thomson. 2017. Does lack of pollination extend flower life? *Journal of Pollination Ecology* 21: 86-91. [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2017\)447](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2017)447).
- Fürst, M. A., D. P. McMahon, J. L. Osborne, R. J. Paxton, and M. Brown. 2014. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 506(7488):364-366. <https://doi.org/10.1038/nature12977>.
- Gallai, N., J. M. Salles, J. Settele, and B. E. Vaissière. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68:810-821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>.
- Galloni, M., and G. Cristofolini. 2003. Floral rewards and pollination in Cytiseae (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 238(1):127-137. <https://doi.org/10.1007/s00606-002-0270-5>.
- Garibaldi, L. A., I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M. A. Aizen, R. Bommarco, et al. 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339(6127): 1608-1611. <https://doi.org/10.1126/science.1230200>.
- Garibaldi, L. A., L. G. Carvalheiro, S. D. Leonhardt, M. A. Aizen, and B. R. Blaauw. 2014. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment* 12(8):439-447. <https://doi.org/10.1890/130330>.
- Garibaldi, L. A., A. Sáez, M. A. Aizen, T. Fijen, and I. Bartomeus. 2020. Crop pollination management needs flower visitor monitoring and target values. *Journal of Applied Ecology* 57(4):664-670. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13574>.

- Gavini, S. S., and A. Farji-Brener. 2015. La importancia del color: morfos florales, tasas de visita y éxito reproductivo en el arbusto *Sarothamnus scoparius*. *Ecología Austral* 25:204-211. <https://doi.org/10.25260/EA.15.25.3.0.82>.
- Goulson, D. 2003. Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34(1):1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132355>.
- Goulson, D. 2010. Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America. *Applied Entomology and Zoology* 45(1):7-12. <https://doi.org/10.1303/aez.2010.7>.
- Graffigna, S., H. J. Marrero, and J. P. Torretta. 2021. Glyphosate commercial formulation negatively affects the reproductive success of solitary wild bees in a Pampean agroecosystem. *Apidologie* 52(1):272-281. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00816-8>.
- Groeneveld, J. H., T. Tschamtkke, G. Moser, and Y. Clough. 2010. Experimental evidence for stronger cacao yield limitation by pollination than by plant resources. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12:183-191. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2010.02.005>.
- Haedo, J. P., L. C. Martínez, S. Graffigna, H. J. Marrero, and J. P. Torretta. 2022. Managed and wild bees contribute to alfalfa (*Medicago sativa*) pollination. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 324:107711. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107711>.
- Hass, A. L., U. G. Kormann, T. Tschamtkke, Y. Clough, A. Bøsem Baillod, C. Sirami, L. Fahrig, J.-L. Martin, J. Baudry, C. Bertrand, J. Bosch, L. Brotons, F. Burel, R. Georges, D. Giralt, M. A. Marcos-García, A. Ricarte, G. Siriwardena, and P. Batáry. 2018. Landscape configurational heterogeneity by small-scale agriculture, not crop diversity, maintains pollinators and plant reproduction in western Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285(1872): 20172242. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2242>.
- Kennedy, C. M., E. Lonsdorf, M. C. Neel, N. M. Williams, T. H. Ricketts, R. Winfree, R. Bommarco, C. Brittain, A. L. Burley, D. Cariveau, L. G. Carvalheiro, N. P. Chacoff, S. A. Cunningham, B. N. Danforth, J.-H. Dudenhöffer, E. Elle, H. R. Gaines, L. A. Garibaldi, C. Gratton, A. Holzschuh, R. Isaacs, S. K. Javorek, S. Jha, A. M. Klein, K. Krewenka, Y. Mandelik, M. M. Mayfield, L. Morandin, L. A. Neame, M. Otieno, M. Park, S. G. Potts, M. Rundlöf, A. Saez, I. Steffan-Dewenter, H. Taki, B. Felipe Viana, C. Westphal, J. K. Wilson, S. S. Greenleaf, and C. Kremen. 2013. A global quantitative synthesis of local and landscape effects on wild bee pollinators in agroecosystems. *Ecology Letters* 16(5): 584-599. <https://doi.org/10.1111/ele.12082>.
- Klein, A. M., B. E. Vaissiere, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen, and T. Tschamtkke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.
- Lautenbach, S., R. Seppelt, J. Liebscher, and C. F. Dormann. 2012. Spatial and temporal trends of global pollination benefit. *PLoS ONE* 7(4):e35954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035954>.
- Lázaro, A., and D. Alomar. 2019. Landscape heterogeneity increases the spatial stability of pollination services to almond trees through the stability of pollinator visits. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 279:149-155. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.02.009>.
- Linsley, G. E. 1946. Insect pollinators of alfalfa in California. *J Econ Entomol* 39:18-29. <https://doi.org/10.1093/jee/39.1.18>.
- Liss, K. N., M. G. Mitchell, G. K. MacDonald, S. L. Mahajan, J. Méthot, A. L. Jacob, D. Y. Maguire, G. S. Metson, C. Ziter, K. Dancose, K. Martins, M. Terrado, and E. M. Bennett. 2013. Variability in ecosystem service measurement: a pollination service case study. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11:414-422. <https://doi.org/10.1890/120189>.
- López, J., T. Rodríguez-Riaño, A. Ortega-Olivencia, J. A. Devesa, and T. Ruiz. 1999. Pollination mechanisms and pollen-ovule ratios in some Genisteae (Fabaceae) from Southwestern Europe. *Plant Systematics and Evolution* 216:23-47. <https://doi.org/10.1007/BF00985099>.
- Melathopoulos, A. P., G. C. Cutler, and P. Tyedmers. 2015. Where is the value in valuing pollination ecosystem services to agriculture? *Ecological Economics* 109:59-70. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2014.11.007>.
- Morales, C. L., A. Sáez, M. P. Arbetman, L. Cavallero, and M. A. Aizen. 2014. Detrimental effects of volcanic ash deposition on bee fauna and plant-pollinator interactions. *Ecología Austral* 24:42-50. <https://doi.org/10.25260/EA.14.24.1.0.36>.
- Morris, W. F., D. P. Vázquez, and N. P. Chacoff. 2010. Benefit and cost curves for typical pollination mutualisms. *Ecology* 91:1276-1285. <https://doi.org/10.1890/08-2278.1>.
- Moschetti, C. J., E. M. Martínez, E. M. Echeverría, and L. M. Ávalos. 2007. Producción de semilla de alfalfa. Pp. 407-442 *en* D. H. Basigalup (ed.). *El cultivo de alfalfa en Argentina*. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Parker, I. M. 1997. Pollinator limitation of *Cytisus scoparius* (Scotch broom), an invasive exotic shrub. *Ecology* 78(5): 1457-1470. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1997\)078\[1457:PLOCSS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[1457:PLOCSS]2.0.CO;2).
- Pitts-Singer, T. L., and J. H. Cane. 2011. The alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*: the world's most intensively managed solitary bee. *Annual Review of Entomology* 56:221-237. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144836>.
- R Core Team. 2020. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: [R-project.org](https://www.R-project.org).
- Rodríguez, N., and M. C. Spada. 2007. Morfología de la alfalfa. Pp. 29-43 *en* D. H. Basigalup (ed.). *El cultivo de alfalfa en Argentina*. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Santa-Martínez, E., C. Cardoso Castro, A. Flick, M. Sullivan, H. Riday, M. K. Clayton, and J. Brunet. 2021. Bee species visiting *Medicago sativa* differ in pollen deposition curves with consequences for gene flow. *American Journal of Botany* 108:1016-1028. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1683>.
- Shorthouse, D. P. 2010. SimpleMappR, an online tool to produce publication-quality point maps. URL:

simplemappr.net.

- Stanley, D. A., M. P. Garratt, J. B. Wickens, V. J. Wickens, S. G. Potts, and N. E. Raine. 2015. Neonicotinoid pesticide exposure impairs crop pollination services provided by bumblebees. *Nature* 528(7583):548. <https://doi.org/10.1038/nature16167>.
- Suzuki, N. 2003. Significance of flower exploding pollination on the reproduction of the Scotch broom, *Cytisus scoparius* (Leguminosae). *Ecological Research* 18(5):523-532. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2003.00575.x>.
- Tasei, J. N., M. Picard, and S. Carre. 1978. Les insectes pollinisateurs de la luzerne (*Medicago sativa* L.) en France. *Apidologie* 9:175-194. <https://doi.org/10.1051/apido:19780302>.
- Vaissière, B., B. M. Freitas, and B. Gemmill-Herren. 2011. Protocol to detect and assess pollination deficits in crops: a handbook for its use. FAO, Roma, Italia.
- Viands, D. R., P. Sun, and D. K. Barnes. 1988. Pollination control: Mechanical and sterility. Pp. 931-960 *en* A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill Jr. (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. American Society of Agronomy, Inc. Publishers, Madison, Wisconsin, USA. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr29.c30>.
- Wang, X., H. Liu, L. Huang, S. Zhang, Z. Deng, J. Li, and L. Jin. 2012. Biodiversity of wild alfalfa pollinators and their temporal foraging characters in Hexi Corridor, Northwest China. *Entomol Fennica* 23:4-12. <https://doi.org/10.33338/ef.84561>.
- Watmough, R. H. 1999. The potential of *Megachile gratiosa* Cameron, *Xylocopa caffra* (Linnaeus) (Hymenoptera: Megachilidae and Anthophoridae) and other solitary bees as pollinators of alfalfa, *Medicago sativa* L. (Fabaceae), in the Oudtshoorn District, South Africa. *Afr Entomol* 7:312-315. URL: [journals.co.za/doi/pdf/10.10520/AJA10213589\\_376](http://journals.co.za/doi/pdf/10.10520/AJA10213589_376).