

Impacto de la competencia de *Apis mellifera* sobre el perfil lipídico de dos especies de abejas silvestres en el Parque Nacional del Teide

Impact of *Apis mellifera* competition on the lipid profile of two species of wild bees in the Teide National Park



Trabajo Fin de Grado

Francisco José González Guedes

Tutorizado por Carlos Ruiz Carreira y José Antonio Pérez Pérez

Grado en Biología. Septiembre de 2022

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1. Recogida y organización de muestras	9
3.2. Extracción de lípidos	11
3.3. Determinación del perfil de las clases lipídicas	12
3.4. Transmetilación de lípidos y obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos	13
3.5. Análisis estadístico	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Composición en ácidos grasos y contenido lipídico	16
4.2. Composición en clases lipídicas	24
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

La implantación de miles de colmenas de abejas melíferas cada primavera en el Parque Nacional del Teide, afecta de manera negativa a las poblaciones de polinizadores silvestres de la zona. La competencia que ejerce *Apis mellifera* les puede afectar de múltiples maneras incluyendo la disminución de recursos florales y la propagación de enfermedades, entre otras. Por ello, el objetivo general de este estudio es determinar el grado de competencia que puede ejercer *Apis mellifera* en dos especies de abejas silvestres (*Hylaeus canariensis* y *Osmia submicans*) a través de la determinación del contenido lipídico y el perfil de ácidos grasos y clases lipídicas de las especies silvestres. Los resultados obtenidos han mostrado variaciones con la distancia de captura con respecto a las colmenas de abejas melíferas, indicando que la presencia de este gran número de abejas de la miel puede generar deficiencias en la composición lipídica de las especies silvestres. Estos resultados pueden dar lugar a futuras líneas de investigación que aborden la importancia de los lípidos y ácidos grasos, y los problemas que podría acarrear su desbalance para la salud y bienestar de las abejas.

Palabras clave: ácidos grasos, *Apis mellifera*, *Hylaeus canariensis*, *Osmia submicans*, competencia.

ABSTRACT

The implantation of thousands of honey bee hives each spring at the Teide National Park negatively affects the wild pollinator populations in the area. The competence exerted by *Apis mellifera* can affect wild populations in many ways including a decrease in floral resources and spreading diseases, among others. Therefore, the general objective of this study is to determine the degree of competition that *Apis mellifera* can exert over two species of wild bees (*Hylaeus canariensis* and *Osmia submicans*) through the determination of the lipid content, and the fatty acid and lipid classes profiles of wild species. The obtained results have shown variations with capture distances from the honey bee hives, indicating that the presence of this large number of honey bees can generate deficiencies in the lipid composition of wild species. These results may give rise to future lines of research addressing the importance of lipids and fatty acids, and the problems that their unbalance might entail for the health and well-being of bees.

Keywords: fatty acids, *Apis mellifera*, *Hylaeus canariensis*, *Osmia submicans*, competence.

1. INTRODUCCIÓN

Las abejas son el principal grupo de polinizadores y dependen enteramente de los recursos florales durante todo su ciclo vital (desarrollo, supervivencia y reproducción). La disminución de los recursos nutricionales es por ello, uno de los factores principales implicados en el declive de las abejas (Biesmeijer et al., 2006; Potts et al., 2010; Scheper et al., 2014; Goulson et al., 2015), por lo que el conocimiento de su nutrición es imprescindible para la toma de medidas adecuadas y específicas de conservación. La cantidad y calidad de recursos florales disponibles (polen y néctar) y su distribución temporal, determina en gran medida la salud, la resistencia a los patógenos y el éxito reproductivo de las abejas (Parreño et al., 2022). Por tanto, los recursos florales disponibles constituyen uno de los principales factores que afectan a la diversidad y abundancia de abejas silvestres (Potts et al., 2003; Roulston y Goodell, 2011; Woodard y Jha, 2017).

La cantidad de recursos florales va a estar determinado por la abundancia de flores disponibles en el paisaje (número de plantas en flor y número de flores por individuo). Por el contrario, la calidad de los recursos florales depende de la composición de las especies de plantas con flor, ya que cada especie provee polen o néctar con un perfil nutricional concreto (Filipiak y Filipiak, 2020). Por tanto, va a ser la abundancia y diversidad de especies concretas de plantas con flor la que determine la disponibilidad y la diversidad de los recursos y, por tanto, el paisaje nutricional en el que las abejas se alimentan (Parreño et al., 2022).

La mayoría de las abejas silvestres son especies solitarias, lo que implica que cada hembra adulta construye un nido compuesto por un número variable de cámaras de cría en función de la disponibilidad de recursos florales disponibles. La hembra aprovisiona cada cámara de cría con una cierta cantidad de polen y néctar junto con un solo huevo. Las hembras pueden controlar tanto el sexo como el tamaño de su progenie en función de las provisiones individuales suministradas (Seidelmann et al., 2010). Tras la eclosión, las crías dependen de las provisiones maternas depositadas para obtener una nutrición y unas reservas energéticas adecuadas a lo largo de su desarrollo larvario, ya que permanecerán en la cámara de cría hasta transformarse en adultos e hibernarán allí hasta la próxima primavera (Dharampall et al., 2019).

El néctar proporciona carbohidratos que son la principal fuente de energía. Por otro lado, el polen es la principal fuente de proteínas y lípidos para las abejas, así como de vitaminas, compuestos fenólicos y flavonoides (Arien et al., 2018). Estos micronutrientes son esenciales para el desarrollo y reproducción de los adultos ya que se ha demostrado que afectan al comportamiento, a la resistencia a enfermedades y al desarrollo de los ovarios. De igual forma, la cantidad y calidad del polen es un factor vital para el crecimiento y desarrollo de las larvas (Airen et al., 2015; Vaudo et al., 2020; Parreño et al., 2022) y determina el número de crías del siguiente año (Cane y Tepedino, 2017). Por tanto, el recurso polínico, es el principal factor nutricional que limita y condiciona las poblaciones de abejas (Parreño et al., 2022).

El polen de las diferentes especies de plantas difiere notablemente en su contenido nutricional (Roulston et al., 2000) tanto en micronutrientes (Filipiak y Filipiak, 2020), como en la cantidad de lípidos y en su proporción de ácidos grasos esenciales (Manning, 2001; Arien et al., 2015). Estudios recientes indican que los lípidos incorporados en la dieta van a repercutir en la composición de ácidos grasos de los tejidos de las abejas, incluyendo el contenido de lípidos abdominales (Arien et al., 2015). Los lípidos y proteínas presentes en el polen son la principal fuente de almacenamiento de energía, por lo que van a afectar directamente a diversos rasgos funcionales de las abejas como la capacidad de dispersión, reproducción, diapausa y supervivencia (Arrese y Soulages, 2010). Asimismo, diversos estudios han demostrado que la composición de lípidos corporales de las abejas afecta a diversos procesos esenciales en el desarrollo larvario y supervivencia de estas (Giri y Dillon, 2012; Arien et al., 2015, 2020; Woodard y Jha, 2017; CaraDonna et al., 2018).

1.1 Los lípidos en la naturaleza

Es probable que cada especie de abeja tenga diferentes requisitos nutricionales cuantitativos y cualitativos, que difieren en función del tamaño y sexo de la cría, el grado de sociabilidad y el nicho trófico de la especie. Mientras que la mayoría de las abejas son solitarias (una sola hembra reproductora pone huevos y aprovisiona la cría) y oligolécticas (especializadas en una familia o género de plantas), la mayoría de la literatura que estudia las necesidades nutricionales de las abejas se ha centrado en dos especies: las abejas melíferas y los abejorros, los cuales son sociales (viven en colonias con cuidado cooperativo de cría y superposición de generaciones) y generalistas (se alimentan de una

amplia gama de especies de plantas en diferentes familias). Los requisitos nutricionales de las abejas melíferas (colonia, adultos y larvas) se han revisado exhaustivamente y, aunque este nivel de detalle no existe para otras especies de abejas y podemos suponer que otras especies tienen demandas de macronutrientes similares, las proporciones de macronutrientes requeridas pueden ser específicas de la especie (Vaudo et al., 2015)

Los lípidos son importantes para las abejas principalmente como fuente de energía, estando algunos componentes lipídicos involucrados en la síntesis de cuerpos grasos y glucógeno de reserva, y en la estructura de la membrana de las células. Los componentes lipídicos como los ácidos grasos, los esteroides, etc. son importantes en el desarrollo, la nutrición y la reproducción (Manning, 2001). La mayoría de los ácidos grasos se pueden sintetizar endógenamente de acuerdo con las necesidades del organismo, y aquellos que no se pueden producir *de novo* deben proporcionarse a través de la dieta, por lo que se denominan ácidos grasos esenciales (Arien et al., 2018). Dos grupos de ácidos grasos esenciales son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, del inglés *Polyunsaturated Fatty Acids*) omega-3 y omega-6. Algunos ejemplos de estos ácidos grasos que son esenciales para la mayoría de las especies de insectos son el ácido linoleico (18:2n-6), que ha sido asociado a una mayor capacidad de forrajeo (Vaudo et al., 2015) y el ácido linolénico (18:3n-3), que cumple un papel crucial para las funciones cognitivas de las abejas (Arien et al., 2018). Otros compuestos como los esteroides, que se obtienen exclusivamente del polen son los precursores de las hormonas de la muda, por lo que son fundamentales para el desarrollo larvario (Vaudo et al., 2015).

1.2 Competencia por los recursos

La disponibilidad de recursos florales también puede estar condicionada por la competencia por el alimento entre diferentes polinizadores pudiendo acarrear, por tanto, consecuencias en el éxito reproductivo de las abejas silvestres. Esta competencia podría tener efectos negativos en el caso de que las abejas silvestres se vean obligadas a alimentarse de plantas menos nutritivas, o a pasar más tiempo buscando flores que no estén ocupadas o cuyos recursos se hayan agotado (Mallinger et al., 2017; Thomson y Page, 2020). La competencia puede producirse de forma natural entre especies silvestres o por efecto antrópico con la introducción de especies invasoras o con la introducción de especies domésticas de forma masiva en un ecosistema, como es el caso de las especies

manejadas de abeja de la miel, abejorros o abejas solitarias del género *Megachile* u *Osmia* (Geslin et al., 2017; Osterman et al., 2021; Russo et al., 2021).

La abeja de la miel (*Apis mellifera*) es una especie económicamente importante que se ha introducido en casi todo el mundo para la polinización de cultivos y la producción de miel (Osterman et al., 2021). Las abejas melíferas son recolectoras altamente eficientes de néctar y de polen, por lo que en altas densidades influyen en la disponibilidad local de polen y néctar, potencialmente creando un escenario de competencia con otros polinizadores (Thomson y Page, 2020). Esto se ve agravado por la capacidad de las abejas melíferas para reclutar recolectoras en parches de flores (Torné-Noguera et al., 2016). Además, pueden generar otros impactos como alterar la estructura y el funcionamiento de las redes de polinización en los ecosistemas naturales, y por tanto, la reproducción de las plantas (Valido et al., 2019) o la propagación de enfermedades a los polinizadores silvestres a través de flores compartidas (Geldmann y González Varo, 2018; Piot et al., 2022), un efecto que probablemente se amplifica por el comercio y trashumancia de las abejas melíferas (Martínez-López et al., 2022).

Existen dos tipos principales de competencia: por interferencia y por explotación. En la competencia por interferencia, los organismos interactúan directamente a través de la lucha u otro contacto físico. Por contra, la competencia de explotación implica el uso y el agotamiento de un recurso, reduciendo así las cantidades disponibles para otros organismos (Wojcik et al., 2018). La principal forma de competencia de las abejas domésticas es la de explotación, pero existe alguna evidencia de que puede ocurrir competencia de interferencia. Por ejemplo, Rogers et al. (2013) concluyeron que las abejas eran significativamente menos propensas a volver a un sitio de pecoreo si tenían un encuentro físico con *A. mellifera*, lo que sugiere una competencia de interferencia favorable a *A. mellifera*. Por otro lado, la competencia por explotación se produce cuando el consumo de los recursos florales limitantes se superpone entre las diferentes especies, lo que resulta en la reducción del tamaño, la fecundidad o la supervivencia de al menos una de las especies que interactúan (Geslin et al., 2017). En general, esos efectos de competencia abarcan distancias de 600 a 1.100 m alrededor de los colmenares, es decir, cubriendo áreas de 1,1 a 3,8 km² (Henry y Rodet, 2018). Esto sugiere que mayores densidades de colonias de abejas melíferas, acentúen los efectos de competencia por los recursos con consecuencias para la tasa de supervivencia de la próxima generación de las

especies silvestres (Henry y Rodet, 2018). Diversos estudios han demostrado que la competencia por explotación con *A. mellifera* afecta negativamente en la reproducción de especies silvestres, el número de nidos, el número de larvas, el tamaño de estas y la carga polínica de las abejas nativas en zonas de competencia (Sugden y Pyke, 1991; Paine y Roberts, 2005).

A pesar de estos impactos negativos documentados de las abejas melíferas sobre las abejas nativas, varios metaanálisis y revisiones no lograron encontrar evidencias consistentes para demostrar una competencia entre ellas (Goulson, 2003; Paine, 2004; Mallinger et al., 2017). Los diferentes estudios analizados mostraron alta variabilidad en el efecto del impacto, con un 53% de ellos evidenciando efectos negativos en las abejas silvestres, mientras que un 28% no encontró ningún efecto y un 19% obtuvo efectos mixtos (Mallinger et al., 2017). Estas diferencias se deben a la dificultad de medir la competencia ya que hay muchos factores que influyen sobre la competencia y deben tenerse en cuenta. Entre ellos destacan: i) grado de solapamiento del nicho trófico con la especie silvestre, ii) distancia y densidad de colmenas, iii) rango nativo o introducido de *A. mellifera*, iv) vulnerabilidad de la comunidad de polinizadores, v) disponibilidad de recursos florales, vi) heterogeneidad del paisaje, vii) fallos metodológicos, así como viii) dificultad para la evaluación de dichos efectos, ya que, por ejemplo, es difícil excluir abejas melíferas de forma natural.

La apicultura intensiva representa, por tanto, un problema potencial para la conservación de la naturaleza, especialmente en áreas naturales o protegidas con especies de plantas o abejas sensibles o en peligro de extinción, así como en islas oceánicas con altos niveles de endemismo como las Islas Canarias (Henry y Rodet, 2018).

En estas áreas de importancia para la conservación, la apicultura puede requerir evaluaciones de impacto. Las abejas melíferas pueden ser necesarias para la polinización de los cultivos, pero la apicultura es una actividad agraria que no debe confundirse con la conservación de la vida silvestre (Geldmann y González-Varo, 2018). Uno de los ejemplos paradigmáticos del impacto de la apicultura, es el caso del Parque Nacional del Teide, donde a mediados del mes de abril comienza la floración masiva de plantas endémicas como la retama (*Spartocytisus supranubius*), la hierba pajonera (*Descurainia bourgeuana*) y el tajinaste rojo (*Echium wildpretii*) (Valido et al., 2019). Este fenómeno

se caracteriza por suministrar una gran cantidad de recursos de forrajeo (polen y néctar), en un espacio corto de tiempo, a las especies silvestres del Parque (Valido et al., 2011).

Aprovechando esta época de floración, se introducen cada primavera hasta 2.700 colmenas para la producción de mieles monoflorales de retama del Teide (Valido et al., 2019). Esta irrupción de alta densidad apícola puede tener un impacto negativo y duradero sobre la biodiversidad en este área natural protegida, y sobre todo, afecta a los polinizadores silvestres nativos que pueden verse desplazados por *A. mellifera* (Henry y Rodet, 2018). Estudios previos han demostrado el impacto de la apicultura en la diversidad de polinizadores, en las redes de polinización, así como en la reproducción de plantas del Parque (Valido et al., 2019). Sin embargo, no se conocen los efectos sobre la reproducción y supervivencia de las abejas silvestres.

2. OBJETIVOS

Determinar el potencial impacto nutricional de la competencia entre las abejas silvestres (*Osmia submicans* e *Hylaeus canariensis*) y las abejas de la miel (*Apis mellifera*) introducidas en el Parque Nacional de El Teide en un gradiente de intensidad apícola.

Para la consecución de este objetivo general, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el contenido lipídico y el perfil de ácidos grasos de ambas especies silvestres.
- Determinar el perfil de clases lipídicas de las especies silvestres.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Recogida y organización de muestras

Durante la primavera de 2019 se realizó un muestreo en el Llano de Maja, situado en la región oriental del Parque Nacional del Teide. Se trata de un amplio valle de unas 250 ha formado por matorral de alta montaña con dos especies dominantes: la retama del Teide (*S. supranubius*), una fabácea endémica de Tenerife y La Palma, y la hierba pajonera (*D. bourgeauana*). Este valle destaca por ser uno de los mayores asentamientos apícolas del Parque Nacional con 400 colmenas/año autorizadas, donde se realiza la apicultura trashumante durante las primaveras.

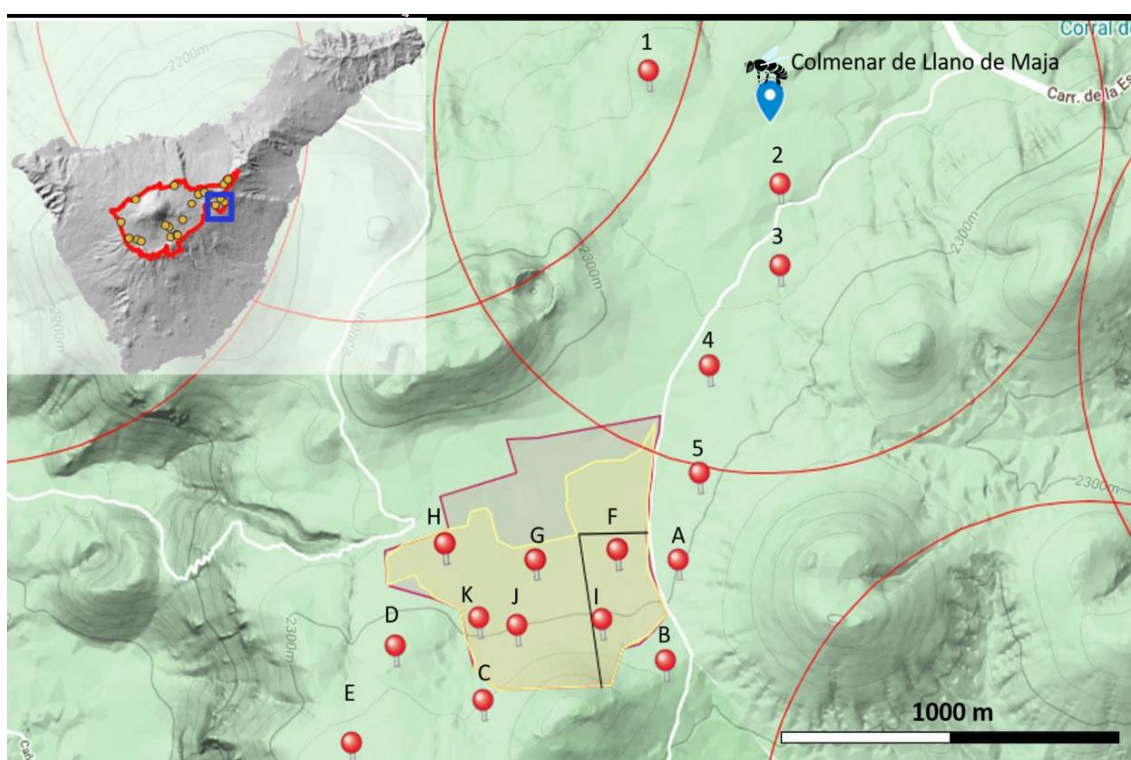


Figura 1. Área de estudio indicando la disposición del Colmenar de Llano de Maja y su área de influencia de 1 km (círculo rojo), con respecto a los puntos de muestreo (1-5; A-K) analizados en un estudio previo (Pérez, 2020) y el área de influencia de otros colmenares cercanos.

Para evaluar el efecto de la competencia de la abeja doméstica con las especies de abejas silvestres, se colocaron cajas nido a lo largo de un gradiente de intensidad apícola, con canutos de tres diámetros (3, 4 y 5 mm) para maximizar el número de especies que ocupaban las cajas nido. Se agruparon los puntos de muestreo (1-5, y A-K, Fig. 1) en cuatro categorías de distancia a las colmenas: distancia mínima (200 m de los apiarios:

unidad 2), distancia media (de 400 a 700 m: unidades 3-4), distancia alta (de 1000 a 1500 m, unidades 5, A y B), y distancia máxima (de 1800 a 2100 m de los apiarios, unidades C y E) (Figura 1).



Figura. 2. Investigador revisando las cajas nido en el Llano de Maja

En las cajas-nido se obtuvieron puestas de dos especies silvestres de distinta familia y con diferentes roles funcionales en el Parque Nacional: *O. submicans* e *H. canariensis* (figura 2). La especie nativa *O. submicans* (Fig. 3a) pertenece a la familia Megachilidae, tiene un tamaño mediano (machos de 8 mm, hembras de 9 mm) y está adaptada a una gran variedad de hábitats, desde la vegetación del piso basal hasta los matorrales de alta montaña, por encima de los 2000 metros. Dentro del Parque Nacional en general, y en el Llano de Maja en particular, destaca por su baja abundancia, ya que se encuentra en su límite de distribución potencial (Ruiz com. pers.). Por su parte, *H. canariensis* (Fig. 3b) es un endemismo monoinsular de Tenerife de la familia Colletidae, con una distribución restringida prácticamente dentro del Parque Nacional del Teide, donde es la segunda especie solitaria dominante. De pequeño tamaño (3-3,5 mm machos y hembras), de color negruzco y poca pilosidad, los machos presentan una mácula facial blanquecina característica, así como bandas amarillas en las patas y un menor tamaño que las hembras. A diferencia de la mayoría de las abejas, las especies del género *Hylaeus*, se caracterizan por transportar el polen en el buche.



Figura 3. Ejemplares de abejas silvestres estudiadas: hembra de *Osmia submicans* (a) y macho de *Hylaeus canariensis* (b)

Los nidos se mantuvieron a temperatura ambiente en el Parque hasta la primavera de 2020, donde se aceleró la emergencia de las crías al ponerlos a una altitud menor (Facultad de Ciencias, Sección Biología, Universidad de La Laguna). Las crías emergidas fueron congeladas en las 24 h siguientes a su emergencia para su posterior análisis lipídico.

Por cada categoría de distancia se analizaron como mínimo 6 ejemplares, 3 de cada sexo. A su vez, debido al pequeño tamaño de la especie *H. canariensis* cada muestra se conformó con 2-3 individuos. Esto no fue necesario para *O. submicans* por lo que cada muestra estuvo formada por un único individuo. La especie *H. canariensis* se capturó en las cuatro categorías de distancia a las colmenas de *A. mellifera* (mínima, media, alta y máxima). Cada muestra es de 2-3 individuos, excepto en las hembras del rango de distancia media, donde solo contamos con 5 individuos, por lo que 2 muestras se obtuvieron a partir de 2 individuos y la tercera muestra se obtuvo de un solo individuo. Además, en el rango de distancia máxima sólo se capturó un individuo hembra, por ello, esta muestra será conformada por este único ejemplar. Por otra parte, la especie *O. submicans* sólo se reprodujo en dos de las categorías de distancia: alta (1000 - 1500 m) y máxima (1800 - 2100 m). En el rango de distancia alta, a parte de las hembras, solo se capturó un único individuo macho.

3.2. Extracción de lípidos

La extracción del lípido total de las muestras se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Folch et al. (1957). En primer lugar, se pesaron los individuos que componen cada

muestra y se homogeneizaron con unos 3 mL de cloroformo: metanol (CL:MET; 2:1, v/v) en 3 repeticiones (10 mL en total). Luego, se añadieron 2,5 mL de KCl (0,88%), se agitaron vigorosamente y se centrifugaron las muestras a 1700 rpm durante 5 min. A continuación, se transfirió la fase orgánica, que contiene los lípidos, a un nuevo tubo de ensayo y se evaporó el solvente bajo atmósfera de nitrógeno, trasvasando los lípidos a un vial pequeño pesado previamente. Se volvió a evaporar el solvente con el vaporizador de nitrógeno, quedando sólo el extracto de lípido total en el bote pequeño, que se colocó en un desecador al vacío, durante un mínimo de 5 horas. Transcurrido este tiempo, se pesaron de nuevo los botes y se calculó la cantidad de lípido por diferencia de peso. Por último, las muestras se redisolviéron con CL:MET (2:1, v/v) a una concentración de 10 mg/mL, con 0,01% de butirilhidroxitolueno (BHT), en atmósfera de nitrógeno, y se guardaron a -20 °C para evitar su oxidación y conservarlas correctamente hasta su posterior utilización. Con los datos obtenidos se calculó el % de lípido en peso fresco de cada muestra según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lípido en peso fresco: } \textit{Peso lípido (mg)} \times 100 / \textit{Peso muestra (mg)}$$

3.3. Determinación del perfil de las clases lipídicas

Las clases lipídicas se determinaron por cromatografía en capa fina de alta resolución en placas de HPTLC (del inglés, *High-Performance Thin-Layer Chromatography*) mediante un doble desarrollo (Olsen & Henderson, 1989). Se utilizaron placas de HPTLC de sílice de 10x10 cm, previamente introducidas en una cubeta con 20 mL de éter para eliminar sus impurezas, secándolas posteriormente en estufa a 110°C durante 30 min. A continuación, se marcó cada placa suavemente con lápiz, evitando rascar la sílice. Una alícuota de 30 µg de lípido de cada muestra experimental se inyectó en la placa utilizando una jeringa Hamilton de 10 µL de capacidad, utilizando como estándar externo un extracto de lípido de huevas de bacalao de composición conocida. Asimismo, se dejó una zona de blanco, con el objetivo de poder cuantificar artefactos en el procedimiento de desarrollo de los solventes. Seguidamente, se introdujo la placa en una solución para separar los lípidos polares, compuesta de isopropanol, cloroformo, metil acetato, metanol y KCl (0,25%) (5:5:5:2:1,8 en volumen), y se dejó desarrollar hasta la mitad de la placa. Una vez llegado a este punto, se extrajo la placa de la cubeta y se colocó en un desecador al vacío durante 10 min para eliminar posibles residuos de solventes y evitar su hidratación. Posteriormente, se preparó una solución para separar los lípidos neutros, compuesta de hexano, éter y ácido acético (20:5:0,5 en volumen) que se colocó en una

nueva cubeta, donde se introdujo la placa. Se dejó desarrollar la mezcla de solventes hasta 0,5 cm del límite superior de la placa, tras lo cual se extrajo y se introdujo en desecador al vacío para eliminar los posibles restos de solventes.

A continuación, se llevó a cabo la tinción de la placa con una solución de acetato cúprico y ácido ortofosfórico en metanol, tiñendo de forma homogénea antes de introducirla en estufa a 160°C durante 10-15 min. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la placa unos minutos y se escaneó en un CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) mediante el software winCATS para determinar las bandas de las diferentes clases lipídicas por densitometría. Su procesado y cuantificación se realizó mediante el software VideoScan, de forma que se obtuvo la proporción de cada clase lipídica de las muestras.

3.4. Transmetilación de lípidos y obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos

Para la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME, del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*) se tomó una alícuota de 1 mg de la muestra de lípido total, a la que se añadió un 5% de estándar interno (ácido nonadecanoico, 19:0). Seguidamente, se evaporó completamente el CL: MET usando un vaporizador de nitrógeno. Al extracto de lípido ya seco, se añadió 1 mL de tolueno y 2 mL de ácido sulfúrico en metanol al 1% (v/v), y se agitó fuertemente con un vórtex. Las muestras se dejaron tapadas herméticamente en atmósfera de nitrógeno en un bloque calefactor a 50 °C durante 16 h. Después de este tiempo, las muestras se retiraron del bloque, se dejaron enfriar, se les añadió 2 mL de KHCO₃ al 2% y 5 mL de hexano:dietil éter (1:1, v/v) con BHT, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo y la fase inferior se volvió a lavar y centrifugar con 5 mL de hexano:dietil éter (1:1, v/v). Finalmente, se transfirió la fase superior al tubo nuevo, se evaporó el solvente bajo atmósfera de nitrógeno y se resuspendieron las muestras en 100 µL de hexano.

A continuación, se llevó a cabo la purificación de los FAME mediante cromatografía líquida en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*). Para ello, se utilizó una placa TLC de 20 x 20 cm x 0,25 mm. Se inyectó en cada placa un máximo de 4 muestras experimentales y un estándar externo de hueva de bacalao, con la ayuda de una jeringuilla Hamilton de 100 µL de capacidad. Una vez depositadas en la placa, ésta se introdujo en una cubeta con una solución de hexano, éter y ácido acético (90:10:1, en volumen). La cubeta se tapó y se dejó desarrollar el solvente hasta 1 cm del límite superior de la placa, se extrajo la placa de la cubeta y se secó bajo campana extractora.

Seguidamente, se tiñó con iodina al 1%, cubriendo la zona de las muestras y tiñendo solamente la banda del estándar externo, permitiendo la aparición de una serie de bandas claramente separadas, en orden descendente: BHT, FAME e impurezas. A continuación, se rasparon las bandas donde se encontraban los FAME de las muestras y se introdujeron en tubos de ensayo a los que se añadió 10 mL de hexano:éter. Estos tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, y posteriormente se recogió la fase superior de cada uno de ellos que se introdujo en un tubo nuevo. Por último, se evaporó completamente el solvente bajo atmósfera de nitrógeno, se recuperaron los FAME purificados mediante 1 mL de n-hexano, y se almacenaron en un bote de 1,5 mL de capacidad, en atmósfera de nitrógeno a -20 °C hasta su determinación por cromatografía de gases.

Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó una cromatografía de gases (GC-ULTRA TRACE; Thermo Scientific, Milán, Italia) con inyección en columna y detector de ionización de llama (FID, del inglés *Flame Ionitiation Detector*) bajo las siguientes condiciones:

- Columna de sílice fundida Supelcowax TM 10 (30 m x 0,32 mm I.D, 0,25 µm de espesor; Supelco Inc., Bellefonte, EE.UU.) con fase estacionaria polar.
- El flujo de los gases fue: helio, 1,5 mL/min (gas portador); hidrógeno, 35 mL/min; aire, 350 mL/min.
- Temperatura: Inyector en columna a 50 °C; Detector FID a 240 °C; Columna con rampa de temperatura con las siguientes características: temperatura inicial de 50 °C, tasa de incremento de temperatura de 40 °C/min hasta alcanzar 150 °C, segunda tasa de incremento de 2 °C/min hasta los 200 °C, seguida de un incremento de 1 °C/min hasta 214 °C, y finalmente 40 °C/min hasta una temperatura final de 230 °C, que fue mantenida durante 5 minutos.

La cuantificación de los ácidos grasos es expresada en porcentaje del total de los ácidos grasos en los cromatogramas, y su identificación se llevó a cabo comparando con una mezcla de estándares comerciales de composición conocida (Mix C4-C24 y PUFA No 3, Supelco Inc.).

3.5. Análisis estadístico

Previamente al análisis estadístico, se confirmó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Levene. En los

casos en los que no se cumplía alguna de ellas, los datos fueron sometidos a transformación logarítmica o del arcoseno de la raíz cuadrada. Las comparaciones entre sexos fueron llevadas a cabo mediante una t de Student. Las comparaciones entre distancia a los apiarios de *A. mellifera* de datos homocedásticos y normales, se llevó a cabo mediante una ANOVA de 1 factor seguida del test *post-hoc* de Tukey. Para datos normales pero no homocedásticos, se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni. La significación estadística empleada fue $p < 0,05$. Todos estos análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando el software IBM® SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp., Nueva York, USA) para Windows.

La correlación entre los ácidos grasos y la distancia a los apiarios se analizaron mediante los paquetes *Hmisc* (Harrel y Harrel, 2019) y *corrplot* (Wei et al., 2017). Los análisis se realizaron con el programa R versión 3.6.0 (R Core Team, 2013) en la plataforma R Studio (Allaire, 2012).

En aquellos ácidos grasos que existía correlación significativa se representó la variación con la distancia entre machos y hembras ajustando los datos con una regresión lineal mediante la función *stat_smooth (method = "lm")* del paquete *ggplot2* (Wickham et al., 2016).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición en ácidos grasos y contenido lipídico

En general, e independientemente del sexo, los ejemplares de *H. canariensis*, presentaron proporciones similares de todas las familias de ácidos grasos. Así, el total de ácidos grasos saturados (SFA, del inglés *Saturated Fatty Acids*) osciló entre 26,0 y 36,1%, el de monoinsaturados (MUFA, del inglés *Monounsaturated Fatty Acids*) entre 29,9 y 39,6%, y el de PUFA entre 27,5 y 37,6%. Dentro de los PUFA, fue más elevada la proporción del total de ácidos grasos de la serie omega-3 (17,3-23,7%) (Tabla 1).

Individualmente, los SFAs más representativos en *H. canariensis* fueron el ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0) (10,8-16,8% y 5,8-9,6%, respectivamente) mientras que el ácido oleico (OA, 18:1n-9) fue el MUFA más destacado, presentando porcentajes superiores al 30% en los dos primeros rangos de distancia (200 m y 400 a 700 m) y porcentajes ligeramente inferiores al 30% en el rango de 1000 a 1500 m. Entre los PUFA, destacaron el ácido linoleico (LA; 18:2n-6) con proporciones entre 9,6% y 13,6%, y, especialmente, el ácido linolénico (LNA, 18:3n-3) con valores entre 16,8% y 22,9% (Tabla 1).

A pesar de que los ejemplares de *O. submicans* mostraron mayor variabilidad en los porcentajes de los diferentes grupos de ácidos grasos, el 16:0 y el 18:0 dentro de los SFAs, el 18:1n-9 entre los MUFA, y el 18:2n-6 y el 18:3n-3 entre los PUFA, también fueron sus componentes individuales más abundantes (Tablas 2 y 3). No obstante, se ha evidenciado una clara diferencia de composición entre ambas especies, ya que en *H. canariensis*, cerca del 90% de los MUFA fue el 18:1n-9, mientras que en *O. submicans*, otros monoinsaturados como el ácido palmitoleico (16:1n-7) y el ácido vaccénico (18:1n-7), presentaron proporciones importantes entre 5-12% y 5-6%, respectivamente (Tablas 2 y 3). La presencia de estos dos últimos ácidos grasos exclusivamente en esta especie debe ser analizada en profundidad, y podría estar relacionada con que el recurso alimenticio utilizado fuera diferente al de *H. canariensis*.

Esta estabilidad en las proporciones de los ácidos grasos más abundantes en ambas especies de abejas silvestres sugiere la importancia de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena media (16 y 18C) en el mantenimiento de las funciones fisiológicas de las abejas. Así, los SFA y MUFA suelen estar relacionados en el reino animal con funciones de almacenamiento y obtención de energía (Tocher, 2003), que

podría tener especial relevancia en animales con elevados requerimientos energéticos como pueden ser los insectos voladores. Además, estos ácidos pueden desarrollar otras funciones como aislamiento térmico, y como posibles sustratos para la síntesis de MUFA de longitud de cadena media-larga, mediante la actuación de enzimas desaturasas como la $\Delta 9$ (Guerrero & Rogers, 2017). No obstante, no se puede descartar la acumulación tisular de estos ácidos grasos a través de su ingesta por la dieta, por lo que sería aconsejable, poder analizar bioquímicamente los recursos florales utilizados por ambas especies en los diferentes rangos de distancia a las colmenas de *A. mellifera*.

Independientemente del rango de distancia, los machos de ambas especies tienden a presentar un porcentaje mayor de SFA de cadena corta (10:0, 11:0, 12:0, 14:0, 15:0 y 16:0), siendo frecuente la ausencia de los de 10 y 11 C en ejemplares hembras. La alta variabilidad de dichos ácidos grasos en las muestras, podría ser la causa de que estas diferencias fueran significativas únicamente para el porcentaje de 10:0 en *H. canariensis* en el rango 400-700 m (hembras, $0,42 \pm 0,30\%$; machos, $1,11 \pm 0,44\%$) (Tablas 1 y 2).

En machos, el porcentaje total de SFA y de MUFA es mayor que en hembras y, por el contrario, el total de ácidos grasos omega-3 y omega-6 PUFA presentan la tendencia contraria. En el rango 400-700 m, el porcentaje de n-3 LC PUFA fue significativamente mayor en hembras que en machos ($0,92 \pm 0,24\%$ en hembras y $0,25 \pm 0,16\%$ en machos).

Finalmente, la relación entre ácidos grasos omega-6 y omega-3, indicador de buena salud para las abejas (Arien et al., 2018, 2020), mantiene una proporción cercana al óptimo, considerándose como óptima una proporción de 1 (Arien et al, 2018). Por lo que, la competencia con *A. mellifera* no parece afectar al ratio omega-6:omega-3. Esto puede deberse a que este estudio ha sido realizado con abejas silvestres que se han podido adaptar regulando por ellas mismas esta relación de ácidos grasos omega 6 y omega 3, o bien escogiendo el tipo de polen del que se alimentan.

El porcentaje de lípido también tiende a ser mayor en los machos de ambas especies, especialmente en distancias altas, aunque la diferencia sólo fue significativa en el rango de 1000 a 1500 m para ejemplares de *H. canariensis*, y de 1800 a 2100 m en *O. submicans* (Tablas 1 y 2). Esto concuerda con lo observado previamente por otros autores en relación a que las hembras consumen una elevada proporción de sus lípidos corporales inmediatamente después de emerger, probablemente para la utilización de esta grasa corporal en la fabricación de oocitos (ver O'Neill et al., 2015).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos (% del total) y contenido lipídico de los ejemplares machos y hembras de *H. canariensis* capturados a diferentes distancias de los apiarios de *A. mellifera*.

Distancia	200 m		400-700 m		1000-1500 m	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
10:0	nd	0,34 ± 0,09	0,42 ± 0,30	1,11 ± 0,44*	1,18 ± 1,45	1,43 ± 0,34
11:0	nd	0,17 ± 0,14	nd	0,25 ± 0,04	0,70 ± 0,44	0,56 ± 0,23
12:0	0,90 ± 1,14	2,26 ± 1,66	1,75 ± 1,88	5,01 ± 3,73	2,65 ± 4,10	3,88 ± 1,56
14:0	1,95 ± 1,80	3,18 ± 1,99	2,65 ± 2,35	5,70 ± 3,70	2,79 ± 3,68	3,81 ± 2,20
15:0	0,22 ± 0,11	0,16 ± 0,10	0,19 ± 0,07	0,12 ± 0,06	nd	0,53 ± 0,63
16:0	11,08 ± 3,78	12,63 ± 3,54	12,07 ± 5,43	16,82 ± 5,65	10,83 ± 5,67	14,03 ± 2,92
18:0	9,55 ± 2,54	7,44 ± 1,86	7,67 ± 1,17	5,82 ± 2,11	8,08 ± 2,59	7,94 ± 2,22
20:0	1,19 ± 0,20	0,99 ± 0,28	0,91 ± 0,11	0,75 ± 0,24	0,94 ± 0,22	0,98 ± 0,36
22:0	0,80 ± 0,23	0,54 ± 0,24	0,58 ± 0,11	0,37 ± 0,19	0,67 ± 0,29	0,56 ± 0,27
24:0	0,30 ± 0,14	0,21 ± 0,09	0,32 ± 0,09	0,14 ± 0,06*	0,27 ± 0,15	0,20 ± 0,05
Total SFA	26,01 ± 4,29	27,90 ± 4,60	26,55 ± 8,41	36,11 ± 10,78	28,12 ± 11,61	33,92 ± 2,69
14:1n-5	0,17 ± 0,06	0,17 ± 0,05	nd	0,17 ± 0,04	0,18 ± 0,08	0,26 ± 0,12
16:1n-9	0,85 ± 0,21	0,85 ± 0,04	0,71 ± 0,03	0,72 ± 0,09	0,58 ± 0,05	0,73 ± 0,09*
16:1n-7	0,75 ± 0,22	1,01 ± 0,43	0,72 ± 0,29	1,10 ± 0,45	0,80 ± 0,57	1,20 ± 0,30
17:1	0,26 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,27 ± 0,06
18:1n-9	33,32 ± 1,80	35,71 ± 3,72	30,02 ± 3,08	31,01 ± 2,74	26,95 ± 1,24	29,47 ± 3,19
18:1n-7	0,99 ± 0,04	0,87 ± 0,09*	0,83 ± 0,06	0,80 ± 0,20	0,80 ± 0,10	1,03 ± 0,10*
18:1n-5	0,12 ± 0,04	0,21 ± 0,07	nd	0,18 ± 0,06	nd	0,22 ± 0,02
20:1n-9	0,23 ± 0,05	0,18 ± 0,06	0,18 ± 0,04	0,09 ± 0,03*	nd	0,24 ± 0,02
22:1n-11	nd	0,09 ± 0,08	0,17 ± 0,06	0,10 ± 0,06	0,19 ± 0,10	0,19 ± 0,09
22:1n-9	0,13 ± 0,07	0,14 ± 0,05	nd	nd	nd	nd
24:1n-9	0,21 ± 0,05	0,18 ± 0,11	0,30 ± 0,20	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,13	0,25 ± 0,13
Total MUFA	37,03 ± 2,17	39,64 ± 4,21	33,13 ± 3,09	34,48 ± 2,84	29,86 ± 1,59	33,86 ± 3,31

18:2n-6 (LA)	12,40 ± 1,87	9,96 ± 2,57	12,91 ± 3,90	9,60 ± 4,05	13,60 ± 4,20	10,83 ± 2,89
20:2n-6	0,33 ± 0,05	0,27 ± 0,09	0,35 ± 0,08	0,19 ± 0,13	0,20 ± 0,12	0,26 ± 0,15
22:2n-6	0,29 ± 0,07	0,26 ± 0,15	0,31 ± 0,09	0,19 ± 0,12	nd	0,19 ± 0,08
22:5n-6	0,21 ± 0,04	0,18 ± 0,08	0,27 ± 0,15	0,09 ± 0,09	nd	nd
Total n-6 PUFA	13,23 ± 1,94	10,68 ± 2,87	13,85 ± 4,15	10,08 ± 4,39*	13,80 ± 4,30	11,28 ± 3,03
18:3n-3 (ALA)	20,34 ± 4,26	18,80 ± 5,13	21,94 ± 6,09	16,81 ± 6,05	22,92 ± 6,86	17,20 ± 2,30
18:4n-3	0,27 ± 0,06	0,26 ± 0,09	0,44 ± 0,17	0,30 ± 0,19	0,45 ± 0,15	0,57 ± 0,41
20:3n-3	nd	nd	0,16 ± 0,04	nd	0,16 ± 0,04	nd
20:4n-3	0,27 ± 0,04	0,22 ± 0,07	0,31 ± 0,02	0,16 ± 0,07*	nd	0,20 ± 0,09
21:5n-3	nd	0,16 ± 0,08	0,18 ± 0,06	nd	0,14 ± 0,05	nd
Total n-3 PUFA	20,89 ± 4,32	19,43 ± 5,32	23,03 ± 6,38	17,27 ± 6,31	23,68 ± 7,09	17,96 ± 2,74
Total PUFA	34,68 ± 6,22	30,60 ± 8,22	37,13 ± 10,58	27,54 ± 10,83	37,63 ± 11,49	29,39 ± 5,65
Total n-3 LC-PUFA	0,48 ± 0,08	0,56 ± 0,22	0,92 ± 0,24	0,25 ± 0,16*	0,30 ± 0,09	0,20 ± 0,09
n-3/n-6	1,57 ± 0,12	1,82 ± 0,14	1,67 ± 0,05	1,82 ± 0,14	1,72 ± 0,05	1,63 ± 0,25
% L.p.f.	4,68 ± 0,16	4,75 ± 0,86	8,01 ± 1,72	14,04 ± 4,79	5,43 ± 0,92	11,66 ± 4,97*

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; % L.p.f., porcentaje de lípido en peso fresco. (*) Indica diferencias significativas entre sexos para una misma distancia (p<0,05).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos (% del total) y contenido de lipídico de los ejemplares machos y hembras de *O. submicans* capturados en el rango de 1800-2100 m de distancia a los apiarios de *A. mellifera*.

Ácidos grasos	Hembras	Machos
10:0	nd	0,82 ± 0,76
12:0	0,16 ± 0,06	0,28 ± 0,16
14:0	1,81 ± 1,09	2,50 ± 0,77
15:0	nd	0,21 ± 0,23
16:0	11,62 ± 4,10	14,22 ± 2,10
18:0	6,68 ± 2,38	5,91 ± 2,58
20:0	0,63 ± 0,22	0,64 ± 0,33
22:0	0,34 ± 0,13	0,32 ± 0,21
24:0	0,16 ± 0,04	0,20 ± 0,20
Total SFA	21,39 ± 2,62	24,80 ± 2,17
14:1n-5	0,44 ± 0,34	0,97 ± 0,52
16:1n-9	0,47 ± 0,20	1,77 ± 0,54*
16:1n-7	12,01 ± 7,11	14,06 ± 5,92
17:1	0,35 ± 0,01	0,30 ± 0,05
18:1n-9	23,86 ± 1,26	24,22 ± 0,51
18:1n-7	6,30 ± 0,49	6,36 ± 0,50
18:1n-5	0,30 ± 0,11	0,23 ± 0,06
20:1n-9	0,27 ± 0,07	0,37 ± 0,14
22:1n-11	nd	0,10 ± 0,04
Total MUFA	44,32 ± 6,85	48,67 ± 6,85
18:2n-6 (LA)	16,47 ± 4,91	9,55 ± 2,79
20:2n-6	0,23 ± 0,08	0,20 ± 0,09
22:2n-6	0,10 ± 0,03	nd
Total n-6 PUFA	16,80 ± 5,02	9,75 ± 2,72
18:3n-3 (ALA)	14,65 ± 3,89	13,37 ± 5,94
18:4n-3	0,18 ± 0,07	0,26 ± 0,22*
Total n-3 PUFA	14,84 ± 3,95	13,64 ± 6,16
Total PUFA	32,05 ± 8,94	23,76 ± 4,13
Total n-3 LC-PUFA	nd	nd
n-3/n-6	0,89 ± 0,04	1,61 ± 1,22
% L.p.f.	3,83 ± 0,98	6,48 ± 1,46*

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; % L.p.f., porcentaje de lípido en peso fresco. (*) Indica diferencias significativas entre sexos (p<0,05).

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (% del total) y contenido lipídico de los ejemplares hembra de *O. submicans* capturadas a distintos rangos de distancia con respecto a los apiarios de *A. mellifera*: alta (1000-1500 m) y máxima (1800-2100 m).

Ácidos grasos	Alta	Máxima
10:0	nd	0,20 ± 0,18
12:0	0,16 ± 0,06	nd
14:0	1,81 ± 1,09	1,04 ± 0,43
16:0	11,62 ± 4,10	20,93 ± 5,51*
18:0	6,68 ± 2,38	13,44 ± 4,78*
20:0	0,63 ± 0,22	0,81 ± 0,22
22:0	0,34 ± 0,13	0,30 ± 0,10
24:0	0,16 ± 0,04	nd
Total SFA	21,39 ± 2,62	36,71 ± 10,01*
14:1n-5	0,44 ± 0,34	0,18 ± 0,15
16:1n-9	0,47 ± 0,20	0,53 ± 0,05
16:1n-7	12,01 ± 7,11	4,95 ± 3,27
17:1	0,35 ± 0,01	0,27 ± 0,02*
18:1n-9	23,86 ± 1,26	19,11 ± 3,84
18:1n-7	6,30 ± 0,49	4,77 ± 1,60
18:1n-5	0,30 ± 0,11	0,32 ± 0,04
20:1n-9	0,27 ± 0,07	0,32 ± 0,07
22:1n-11	nd	0,46 ± 0,04
Total MUFA	44,32 ± 6,85	31,12 ± 8,71
18:2n-6 (LA)	16,47 ± 4,91	14,36 ± 1,10
20:2n-6	0,23 ± 0,08	0,31 ± 0,08
22:2n-6	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,05
Total n-6 PUFA	16,80 ± 5,02	14,79 ± 1,01
18:3n-3 (ALA)	14,65 ± 3,89	12,74 ± 1,68
18:4n-3	0,18 ± 0,07	0,24 ± 0,05
Total n-3 PUFA	14,84 ± 3,95	12,97 ± 1,73
Total PUFA	32,05 ± 8,94	28,05 ± 2,78
Total n-3 LC-PUFA	nd	nd
n-3/n-6	0,89 ± 0,04	0,88 ± 0,06
% L.p.f.	3,83 ± 0,98	7,33 ± 2,50*

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; % L.p.f., porcentaje de lípido en peso fresco. (*) Indica diferencias significativas entre distancias (p<0,05).

En relación con la distancia a los asentamientos apícolas, se observa una disminución en la proporción de ácido oleico (18:1n-9) para ambos sexos en *H. canariensis* y, por el contrario, un incremento para *O. submicans* (Figura 4). Esta tendencia va acompañada de

una disminución del ácido palmitoleico (16:1n-7) y un incremento del ácido palmítico (16:0) y del esteárico (18:0) en *O. submicans* (Tabla 3).

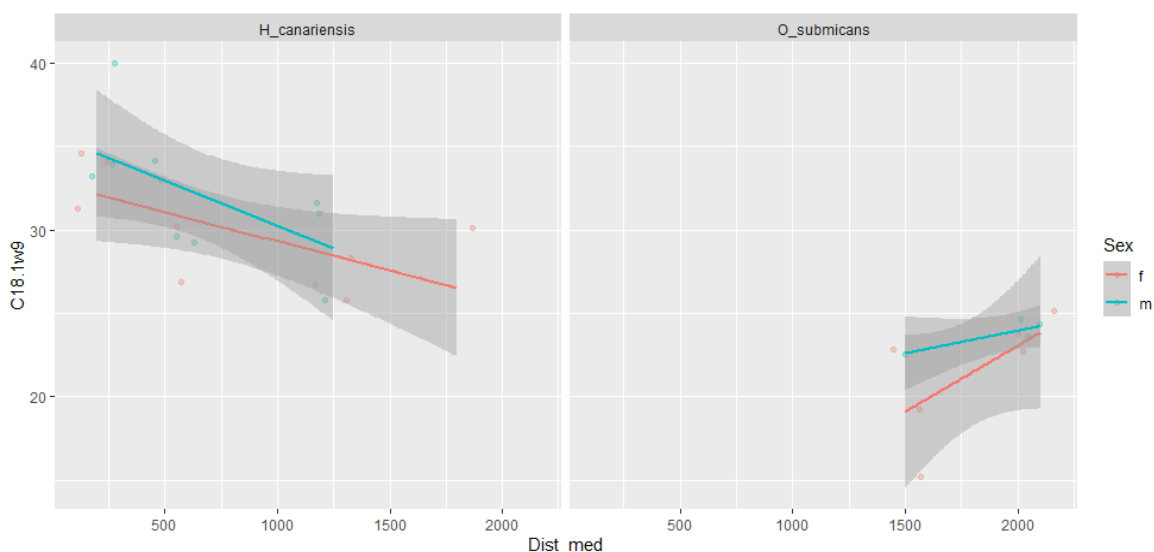


Figura 4. Variación del ácido oléico (18:1 n-9) con la distancia a los apiarios en machos (m; azul) y en hembras (f; rojo) de las especies de abejas silvestres *Hylaeus canariensis* y *Osmia submicans*.

Además, los machos de *H. canariensis* mostraron diferencias significativas en los ácidos grasos 10:0, 11:0, 18:1n-7, 20:1n-9, en el total de n-6 PUFA, y en el % L.p.f., incrementándose los saturados y el contenido lipídico con la distancia (Figura 5). Por el contrario, las hembras de esta especie mostraron diferencias significativas en el 18:1n-9, 18:1n-7, en el total de MUFA y de LC-PUFA, y en el % L.p.f., siendo más abundantes los MUFA en distancias más cercanas a las colmenas de la abeja melífera, mientras que el porcentaje lipídico tendió a incrementar con la distancia (Figura 6).

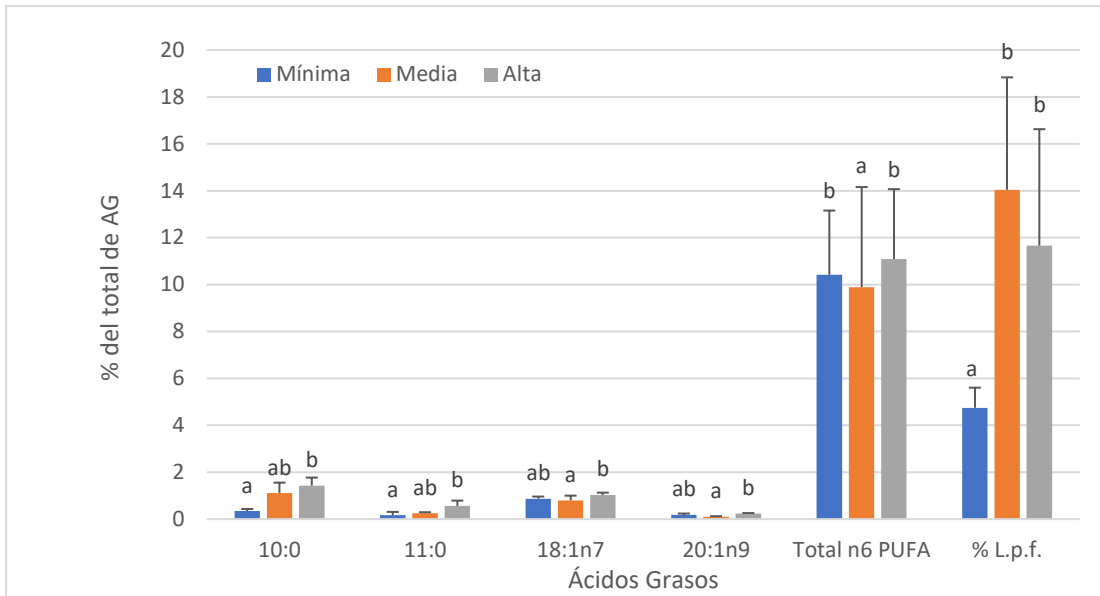


Figura 5. Ácidos grasos que presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes rangos de distancia en los que se capturaron los machos de *H. canariensis*.

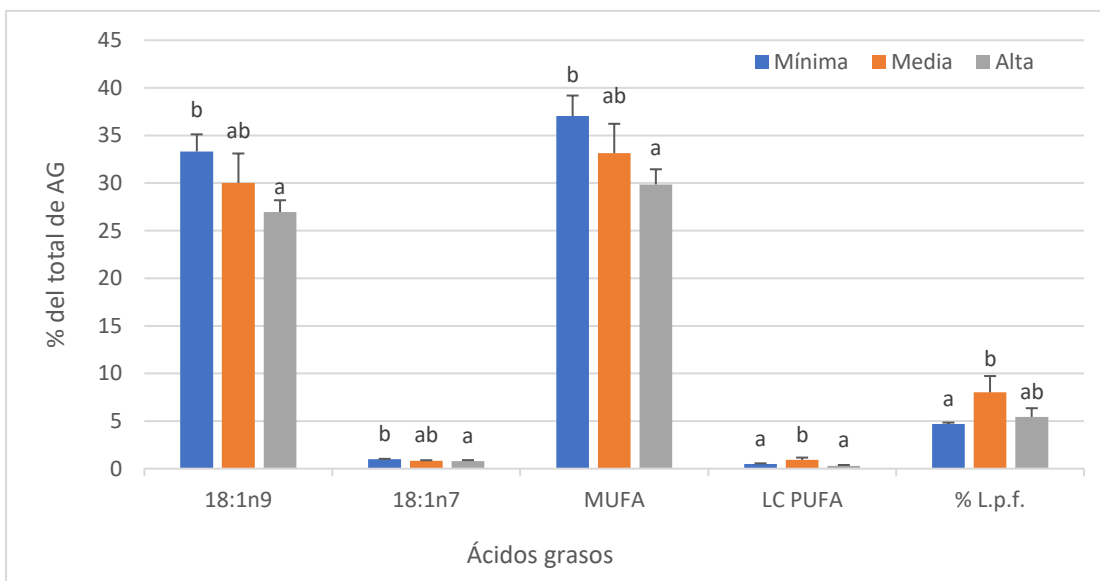


Figura 6. Ácidos grasos que presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes rangos de distancia en los que se capturaron las hembras de *H. canariensis*.

La Tabla 4 muestra los ácidos grasos de ambas especies silvestres que variaron significativamente en función a la distancia con las colmenas de abejas melíferas. La mayoría de ellos mostró una disminución significativa en *H. canariensis* (10 de 12), y un incremento en *O. submicans* (6 de 9).

Tabla 4. Aumento (+) o disminución (-) significativa ($p < 0,05$) de la cantidad de ácidos grasos en relación a la distancia a los asentamientos apícolas. (***) , altamente significativa ($p < 0,01$)

Ácido graso	<i>H. canariensis</i>	<i>O. submicans</i>
10:0	+	
11:0	+	
12:0		+
16:0		-
16:1n-9	-	
16:3n-4		+
17:1		+
18:0		-
18:1n-9	-	+
18:4n-1	- (***)	
20:2n-6	-	
20:4		+
20:4n-3	- (***)	
22:1n-9	- (***)	
22:1n-11		- (***)
22:2n-6	- (***)	
22:5n-6	- (***)	
MUFA	-	+
LC-PUFA	-	
SFA		

4.2. Composición en clases lipídicas

La Tabla 5 muestra la composición de clases lipídicas de *H. canariensis*. La mayor parte de ellas pertenecen a lípidos neutros, superando el 80% total y alcanzando hasta un 89%. Consecuentemente, los lípidos polares presentaron menor cantidad, variando entre un 10% hasta un 18%. Específicamente, dentro de los lípidos neutros las clases lipídicas mejor representadas son los ácidos grasos libres (FFA, 33-52%) y ésteres de esteroles (EE, 11-25%), el resto de las clases lipídicas neutras (monoacilglicérols, colesterol y triacilglicérols) alcanzaron como máximo un 12%. Por otro lado, dentro de las clases lipídicas polares, se observan resultados repartidos en un rango menor, comprendidos entre 1-7%, siendo la fosfatidilcolina la más abundante.

En cuanto a las diferencias significativas entre sexos, observamos que las mayores diferencias se encuentran en los FFA donde las hembras presentan mayor cantidad que los machos, al contrario, los machos presentan mayor cantidad de EE. Por el contrario, en cambio, no se encontraron diferencias significativas en las clases lipídicas polares.

Teniendo en cuenta los rangos de distancia de captura de *H. canariensis*, en las hembras se observan diferencias significativas para FFA y EE. En la distancia mínima, los FFA presentan menor cantidad en comparación a las distancias media y alta y, por el contrario, las hembras capturadas en la distancia mínima contienen mayor proporción de EE.

Para *O. submicans* las clases lipídicas neutras también fueron las más abundantes superando el 90% del total, mientras que las clases lipídicas polares estuvieron presentes en un rango entre el 6,6 y el 8,3%. Dentro de las clases lipídicas neutras, destacaron los FFA y los EE (Tablas 6 y 7). No se registraron diferencias significativas entre sexos para ninguna clase lipídica (Tabla 6).

Las hembras capturadas a diferentes distancias de los asentamientos apícolas mostraron diferencias significativas para los monoacilgliceroles y EE, siendo mayores en la distancia máxima que en la alta ($13,9 \pm 3,4\%$ y $29,0 \pm 2,7\%$ vs $5,1 \pm 0,9\%$ y $19,6 \pm 4,9\%$, respectivamente). Por el contrario, las hembras de *O. submicans* capturadas en la distancia alta presentaron una proporción mayor de FFA en la distancia alta ($49,5 \pm 0,7\%$ frente a $35,5 \pm 7,5\%$, respectivamente) (Tabla 7).

Todos estos cambios registrados en los monoacilgliceroles y FFA dentro de las fracciones lipídicas neutras, están probablemente relacionados con procesos anabólicos y catabólicos que tienen lugar en ambas especies de abejas silvestres. Ambos compuestos son importantes productos intermediarios tanto en la formación de depósitos de reserva energética como en procesos de obtención de energía a través de la beta-oxidación de los ácidos grasos (Tocher, 2003). Por otro lado, los EE son moléculas clave para el aislamiento del tegumento y protección contra agentes externos en ciertos organismos animales, teniendo un papel destacado en procesos reproductivos de muchas especies.

Tabla 5. Composición de clases lipídicas (% de lípido total) de los individuos macho y hembra de *H. canariensis* capturados a distintas distancias de los apiarios de *A. mellifera*.

Distancia	200 m		400 – 700 m		1000 – 1500 m	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
SM	0,52 ± 0,91	0,54 ± 0,65	0,65 ± 0,50	1,69 ± 1,60	0,26 ± 0,19	0,24 ± 0,28
PC	2,74 ± 1,06	3,15 ± 0,97	1,39 ± 1,16	3,26 ± 2,16	1,66 ± 0,32	1,42 ± 0,53
PS	1,30 ± 0,43	1,34 ± 0,52	0,95 ± 1,12	2,64 ± 1,68	1,10 ± 0,22	1,24 ± 0,62
PI	2,19 ± 0,78	2,16 ± 0,08	1,58 ± 0,47	1,28 ± 0,81	1,74 ± 0,33	1,20 ± 0,70
PG	1,25 ± 1,25	2,66 ± 0,07	1,57 ± 0,25	2,01 ± 0,83	1,92 ± 0,40	1,49 ± 1,05
PE	5,67 ± 1,29	7,21 ± 0,62	4,86 ± 0,43	5,01 ± 0,53	6,71 ± 1,11	5,00 ± 1,39
UKP	0,43 ± 0,74	0,20 ± 0,35	0,32 ± 0,30	0,42 ± 0,72	1,22 ± 0,61	1,64 ± 1,13
TLP	14,22 ± 4,86	17,27 ± 2,06	11,31 ± 3,93	16,31 ± 7,27	14,70 ± 1,31	12,23 ± 4,27
MAG	5,25 ± 1,47	4,69 ± 1,50	5,96 ± 1,37	3,77 ± 2,56	7,60 ± 1,99	9,87 ± 3,94
CHO	9,86 ± 0,78	8,39 ± 2,41	10,08 ± 2,55	8,00 ± 3,65	12,19 ± 1,90	9,91 ± 1,92
FFA	40,27 ± 0,38	36,25 ± 0,61*	51,19 ± 11,05	33,27 ± 16,5	48,16 ± 2,39	39,43 ± 2,80*
UKN	2,98 ± 1,93	0,58 ± 0,51	0,11 ± 0,20	0,87 ± 0,94	0,84 ± 0,15	1,47 ± 1,42
TAG	5,93 ± 6,73	8,61 ± 7,50	5,30 ± 7,67	15,27 ± 13,4	4,58 ± 7,48	7,13 ± 5,36
EE	21,49 ± 2,57	24,19 ± 2,57	16,05 ± 1,81	22,51 ± 7,79	11,92 ± 0,34	19,95 ± 0,53*
TLN	85,78 ± 4,86	82,73 ± 2,06	88,69 ± 3,93	83,69 ± 7,27	85,30 ± 1,31	87,77 ± 4,27

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre especies (p<0,05). SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; UKP, desconocidos polares; TLP, total de lípido polares; MAG, monoacilglicérol; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; UKN, desconocidos neutros; TAG, triacilglicérol; EE, ésteres de esterol, TLN, total de lípidos neutros. (*) Indica diferencias significativas entre sexos para una misma distancia (p<0,05).

Tabla 6. Composición de clases lipídicas (% de lípido total) de los individuos machos y hembras de *O. submicans* capturados en el rango de 1800-2100 m de distancia de los apiarios de *A. mellifera*.

	Hembras	Machos
SM	0,59 ± 0,28	0,27 ± 0,35
PC	1,03 ± 0,52	1,10 ± 0,58
PS	0,84 ± 0,80	0,51 ± 0,29
PI	0,97 ± 0,21	0,70 ± 0,46
PG	0,58 ± 0,39	0,77 ± 0,53
PE	2,87 ± 0,61	3,62 ± 1,92
UKP	1,35 ± 0,82	1,31 ± 0,22
TLP	8,22 ± 0,93	8,28 ± 3,43
MAG	5,13 ± 0,96	5,99 ± 6,20
CHO	7,45 ± 0,53	7,88 ± 2,84
FFA	49,53 ± 0,77	42,13 ± 6,98
UKN	0,52 ± 0,48	1,98 ± 1,66
TAG	9,47 ± 6,27	13,42 ± 10,03
EE	19,68 ± 4,92	20,32 ± 3,82
TLN	91,78 ± 0,93	91,72 ± 3,43

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3). SM, esfingomiélin; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; UKP, desconocidos polares; TLP, total de lípidos polares; MAG, monoacilglicérol; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; UKN, desconocidos neutros; TAG, triacilglicérol; EE, ésteres de esterol; TLN, total de lípidos neutros.

Tabla 7. Composición de clases lipídicas (% de lípido total) de los individuos hembras de *O. submicans* capturados en los rangos de distancia alta (1000-1500 m) y máxima (1800-2100 m), con respecto a los apiarios de *A. mellifera*.

	Alta	Máxima
SM	0,59 ± 0,28	0,18 ± 0,18
PC	1,03 ± 0,52	0,86 ± 0,21
PS	0,84 ± 0,80	0,33 ± 0,19
PI	0,97 ± 0,21	0,48 ± 0,46
PG	0,58 ± 0,39	0,53 ± 0,16
PE	2,87 ± 0,61	1,80 ± 0,53
UKP	1,35 ± 0,82	2,45 ± 0,81
TLP	8,22 ± 0,93	6,62 ± 2,12
MAG	5,13 ± 0,96	13,92 ± 3,46*
CHO	7,45 ± 0,53	10,07 ± 1,91
FFA	49,53 ± 0,77	35,57 ± 7,58*
UKN	0,52 ± 0,48	0,74 ± 0,08
TAG	9,47 ± 6,27	4,08 ± 2,70
EE	19,68 ± 4,92	29,00 ± 2,70*
TLN	91,78 ± 0,93	93,38 ± 2,12

Igual a la Tabla 6. (*) Indica diferencias significativas entre distancias (p<0,05).

Los resultados de este estudio demuestran que la competencia de *H. canariensis* y *O. submicans* con *A. mellifera* puede generar variaciones en algunos ácidos grasos, especialmente 10:0, 11:0, 18:1n-9, 18:1-7, 20:1n-9, y en ciertas clases lipídicas neutras como ácidos grasos libres y ésteres de esterol, siendo necesarios estudios futuros que permitan determinar las razones de estas alteraciones, así como la importancia de estos nutrientes en la salud de las abejas.

5. CONCLUSIONES

1. La competencia por los recursos florales con *Apis mellifera* puede generar variaciones en el contenido de lípido y perfil de ácidos grasos y clases lipídicas de *Hylaeus canariensis* y *Osmia submicans*.
2. El porcentaje de lípido en peso fresco es superior en los individuos machos de ambas especies de abejas silvestres, pudiendo ser debido a su utilización para la fabricación de oocitos por parte de las hembras.
3. Los ejemplares de *Osmia submicans* presentaron proporciones más elevadas de los ácidos grasos monoinsaturados, ácido palmitoleico (16:1n-7) y ácido vaccénico (18:1n-7) que los de *Hylaeus canariensis*, aunque se necesitan futuras investigaciones para determinar si estas diferencias son debidas a los recursos florísticos utilizados o a diferencias metabólicas entre ambas especies.
4. Existe escasa literatura científica que aborde las necesidades nutricionales de las abejas silvestres, más específicamente, los problemas que puede suponer el déficit de ciertos ácidos grasos y clases lipídicas para la salud y bienestar de estas, siendo necesarias investigaciones futuras para esclarecer estos requerimientos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allaire, J., (2012). RStudio: integrated development environment for R. Boston, MA, 770, 394.
- Arien, Y., Dag, A., & Shafir, S. (2018). Omega-6: 3 ratio more than absolute lipid level in diet affects associative learning in honey bees. *Frontiers in Psychology*, 9, 1001.
- Arien, Y., Dag, A., Yona, S., Tietel, Z., Cohen, T. L., & Shafir, S. (2020). Effect of diet lipids and omega-6: 3 ratio on honey bee brood development, adult survival and body composition. *Journal of Insect Physiology*, 124, 104074.
- Arien, Y., Dag, A., Zarchin, S., Masci, T., & Shafir, S. (2015). Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15761-15766.
- Arrese, E. L., & Soulagés, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207.
- Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P., Reemer, M., et al. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785), 351-354.
- Cane, J. H., & Tepedino, V. J. (2017). Gauging the effect of honey bee pollen collection on native bee communities. *Conservation Letters*, 10(2), 205-210.
- CaraDonna, P. J., Cunningham, J. L., & Iler, A. M. (2018). Experimental warming in the field delays phenology and reduces body mass, fat content and survival: Implications for the persistence of a pollinator under climate change. *Functional Ecology*, 32(10), 2345-2356.
- Dharampal, P. S., Carlson, C., Currie, C. R., & Steffan, S. A. (2019). Pollen-borne microbes shape bee fitness. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1904), 20182894.
- Filipiak, Z. M., & Filipiak, M. (2020). The scarcity of specific nutrients in wild bee larval food negatively influences certain life history traits. *Biology*, 9(12), 462.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Geldmann, J., & González-Varo, J. P. (2018). Conserving honey bees does not help wildlife. *Science*, 359(6374), 392-393.
- Guerrero, A.I., & Rogers, T.L. (2017). Blubber fatty acid composition and stratification in the crab-eater seal, *Lobodon carcinophaga*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 491, 51-57.
- Geslin, B., Gauzens, B., Baude, M., et al. (2017). Massively introduced managed species and their consequences for plant–pollinator interactions. *Advances in Ecological Research*, 57, 147-199.
- Giri, S., & Dillon, M. (2012). Seasonal and altitudinal variation in fatty acid composition of native bees. *UW-National Park Service Research Station Annual Reports*, 35, 23-30.
- Goulson, D. (2003). Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 1-26.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957.
- Harrell Jr, F. E., & Harrell Jr, M.F.E., (2019). Package ‘Hmisc’. CRAN2018, 2019, 235-6
- Henry, M., & Rodet, G. (2018). Controlling the impact of the managed honeybee on wild bees in protected areas. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Mallinger, R. E., Gaines-Day, H. R., & Gratton, C. (2017). Do managed bees have negative effects on wild bees?: A systematic review of the literature. *PloSOne*, 12(12), e0189268.
- Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82(2), 60-75.
- Martínez-López, V., Ruiz, C., & De la Rúa, P. (2022). Migratory beekeeping and its influence on the prevalence and dispersal of pathogens to managed and wild bees. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 18, 184-193.
- Olsen, R. E., & Henderson, R. J. (1989). The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129(2), 189-197.
- O'Neill, K. M., Delphia, C. M., & Pitts-Singer, T. L. (2015). Seasonal trends in the condition of nesting females of a solitary bee: wing wear, lipid content, and oocyte size. *PeerJ*, 3, e930.
- Osterman, J., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., et al. (2021). Global trends in the number and diversity of managed pollinator species. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 322, 107653.
- Paini, D. R. (2004). Impact of the introduced honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) on native bees: a review. *Austral Ecology*, 29(4), 399-407.

- Paini, D. R., & Roberts, J. D. (2005). Commercial honey bees (*Apis mellifera*) reduce the fecundity of an Australian native bee (*Hylaeus alcyoneus*). *Biological Conservation*, 123(1), 103-112.
- Parreño, M. A., Alaux, C., Brunet, J. L., et al. (2022). Critical links between biodiversity and health in wild bee conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 37(4), 309-321.
- Pérez, D. (2020). Efecto multiescala de *Apis mellifera* en la comunidad de polinizadores y plantas del Parque Nacional del Teide. Trabajo final de máster. Universidad de La Laguna, Tenerife.
- Piot, N., Schweiger, O., Meeus, I., et al. (2022). Honey bees and climate explain viral prevalence in wild bee communities on a continental scale. *Scientific Reports*, 12(1), 1-11.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353.
- Potts, S. G., Vulliamy, B., Dafni, A., Ne'eman, G., & Willmer, P. (2003). Linking bees and flowers: how do floral communities structure pollinator communities? *Ecology*, 84(10), 2628-2642.
- Rogers, S. R., Cajamarca, P., Tarpy, D. R., & Burrack, H. J. (2013). Honey bees and bumble bees respond differently to inter- and intra-specific encounters. *Apidologie*, 44(6), 621-629.
- Roulston, T. A. H., & Goodell, K. (2011). The role of resources and risks in regulating wild bee populations. *Annual Review of Entomology*, 56, 293-312.
- Roulston, T. A. H., Cane, J. H., & Buchmann, S. L. (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny?. *Ecological Monographs*, 70(4), 617-643.
- Russo, L., de Keyser, 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.
- Scheper, J., Reemer, M., van Kats, R., Ozinga, W. A., van der Linden, G. T. J., Schaminée, J. H. J., Siepel, H., & Kleijn, D. (2014). Museum specimens reveal loss of pollen host plants as key factor driving wild bee decline in The Netherlands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(49), 17552-17557.
- Seidelmann, K., Ulbrich, K., & Mielenz, N. (2010). Conditional sex allocation in the Red Mason bee, *Osmia rufa*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(3), 337-347.
- Sugden, E. A., & Pyke, G. H. (1991). Effects of honey bees on colonies of *Exoneura asimillima*, an Australian native bee. *Australian Journal of Ecology*, 16(2), 171-181.
- Thomson, D. M., & Page, M. L. (2020). The importance of competition between insect pollinators in the Anthropocene. *Current Opinion in Insect Science*, 38, 55-62.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107–184.
- Torné-Noguera, A., Rodrigo, A., Osorio, S., & Bosch, J. (2016). Collateral effects of beekeeping: Impacts on pollen-nectar resources and wild bee communities. *Basic and Applied Ecology*, 17(3), 199-209.
- Valido, A., Rodríguez-Rodríguez, M. C., & Jordano, P. (2011). Interacciones entre plantas y polinizadores en el Parque Nacional del Teide: consecuencias ecológicas de la introducción masiva de la abeja doméstica, *Apis mellifera* (Apidae). En: Proyectos de Investigación en Parques Nacionales. MARM (Ed.).
- Valido, A., Rodríguez-Rodríguez, M. C., & Jordano, P. (2019). Honeybees disrupt the structure and functionality of plant-pollinator networks. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 133-141.
- Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Patch, H. M., et al. (2020). Pollen protein: lipid macronutrient ratios may guide broad patterns of bee species floral preferences. *Insects*, 11(2), 132.
- Wickham, H., (2016). ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer
- Wei, T., Simko, V., Levy, M., Xie, Y., Jin, Y., & Zemla, J., (2017). Package ‘*corrplot*’. *Statistician*, 56 (316), e24
- Wojcik, V. A., Morandin, L. A., Davies Adams, L., & Rourke, K. E. (2018). Floral resource competition between honey bees and wild bees: is there clear evidence and can we guide management and conservation?. *Environmental Entomology*, 47(4), 822-833.
- Woodard, S. H., & Jha, S. (2017). Wild bee nutritional ecology: predicting pollinator population dynamics, movement, and services from floral resources. *Current Opinion in Insect Science*, 21, 83-90.