



1

2

Universidad Nacional del Comahue

3

Centro Regional Universitario Bariloche

4

“Impactos de la invasión del abejorro *Bombus terrestris* en la

5

agricultura y apicultura del NO Patagónico”



6

7

8

Trabajo de Tesis para optar al Título

9

de Doctor en Biología

10

Lic. Agustín Sáez

11

Director: Dr. Marcelo A. Aizen

12

Codirector: Dra. Carolina L. Morales

13

2016

1 **Resumen**

2 La relación que se da entre los polinizadores y las plantas es una de las interacciones
3 ecológicas más relevantes, ya que aproximadamente el 90% de las plantas con flor
4 depende de polinizadores para producir semillas y muchos animales requieren de los
5 recursos (e.g. polen y néctar) provistos por las plantas para alimentarse y alimentar su
6 descendencia. Además, el 75% de los cultivos de los cuales obtenemos alimento
7 incrementan su producción a través de la polinización animal, mientras que muchas
8 abejas manejadas por el hombre para la obtención de miel y otros productos apícolas
9 dependen de los recursos brindados por las plantas con flor. Esta relación, por lo tanto,
10 cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la biodiversidad, la integridad a la
11 mayoría de los ecosistemas, e incrementa la producción de alimento para la humanidad.
12 La gran mayoría de las interacciones entre polinizadores y plantas son de naturaleza
13 generalista, donde la mayoría de las especies de plantas son polinizadas por grupos
14 diversos de animales, y la mayoría de los polinizadores obtiene recompensas de
15 distintas especies de plantas. Esta naturaleza difusa de los sistemas de polinización ha
16 permitido que tanto las plantas exóticas y los polinizadores transportados lejos de sus
17 rangos nativos pueden beneficiarse de las interacciones con la fauna y flora indígena,
18 respectivamente. Los seres humanos también nos hemos beneficiado de la naturaleza
19 generalista de este mutualismo cultivando muchas especies dependientes de
20 polinizadores fuera de sus rangos nativos, así como manejando y traslocando
21 polinizadores generalistas para la producción de miel y para suplementar el servicio de
22 polinización a cultivos. Sin embargo, este movimiento intencional de animales y
23 plantas hacia distintas partes del mundo desencadenó numerosas invasiones biológicas,
24 es decir, que luego que la especie se establece fuera de su rango de distribución nativa,
25 alcanzan grandes tamaños poblacionales y se dispersan rápidamente. Las invasiones de
26 polinizadores pueden tener efectos directos sobre su compañero de interacción, que van
27 desde altamente beneficiosas a fuertemente perjudicial, así como indirectos sobre otros
28 polinizadores. Para entender estos impactos contrastantes, aquí estudié los beneficios
29 (deposición de polen, producción de semillas, etc.) y costos (daño floral, robo de néctar,
30 etc.) asociados con las interacciones planta-polinizador y me pregunté cómo la
31 presencia de un invasor abundante afecta el balance de costos-beneficios en los sistemas
32 agrícolas. En esta tesis, primero (Capítulo 1) proveo un modelo conceptual que postula
33 que los llamados “mutualismos de polinización” entre una planta y un polinizador, es

1 una interacción dinámica y cuyo efecto para las partes depende de las densidades
2 relativas de las especies de plantas y polinizadores interactuantes. Este modelo predice
3 que dicha interacción cambia de “mutualista” a “antagonista” cuando una de las partes
4 incrementa desproporcionalmente su abundancia en comparación con su compañero
5 interactuante. Para evaluar este modelo teórico, tomé como sistema de estudio empírico
6 los cultivos de frambuesa (*Rubus idaeus*) del NO Patagónico, los cuales son visitados
7 casi exclusivamente por el abejorro invasor *Bombus terrestris* y la abeja mielera
8 manejada *Apis mellifera*, para evaluar cómo cambios en la frecuencia de interacción
9 afectan los beneficios y costos. A lo largo del Capítulo 2, evalué la calidad de la
10 polinización y de frutos en 16 plantaciones de frambuesa ubicadas en un fuerte
11 gradiente de abundancia de abejorros y abejas. Observé que tanto la cantidad de polen
12 en el estigma como el daño a los estilos se incrementan con la frecuencia de visita de
13 estos polinizadores. Sin embargo, abejorros y abejas contribuyen de forma diferente
14 tanto en la deposición de polen como en el daño floral. La calidad de los frutos fue más
15 afectada por la cantidad de daño que recibieron las flores que por la cantidad de polen
16 recibido. A raíz de estos resultados, desarrollé un modelo estocástico (Capítulo 3) que
17 permite predecir los rangos de frecuencias de visitas de los principales polinizadores (*B.*
18 *terrestris* y *Apis mellifera*) que maximizan la calidad de frutos en frambuesa. Para ello,
19 este modelo mecanístico integra las funciones que describen los procesos de
20 polinización (i.e. deposición de polen) y post-polinización (i.e. cantidad de granos de
21 polen depositados necesarios para gatillar la germinación, tiempo de crecimiento del
22 tubo polínico desde la germinación a la fecundación), así como los costos asociados a la
23 visita del polinizador (particularmente ruptura de estilos), los cuales repercutirán de
24 forma directa en la calidad de los frutos desarrollados. Este modelo predice que entre 6
25 y 22 visitas de *Apis mellifera* y entre 4 y 14 del *Bombus terrestris* a lo largo de la vida
26 de una flor de frambuesa maximizan la calidad de frutos producidos. Finalmente
27 (Capítulo 4), evalué cómo la densidad de abejorros en los cultivos de frambuesa afecta
28 la disponibilidad de recursos para las abejas mieleras a través del robo de néctar en los
29 pimpollos. Observé que cuantos más abejorros forrajean en el cultivo de frambuesa la
30 cantidad de pimpollos robados se incrementa. Este robo de néctar a los pimpollos no
31 solo reduce instantáneamente la cantidad de néctar disponible, sino que también reduce
32 la producción total de néctar de la flor. A pesar que el néctar de frambuesa es uno de
33 los principales recursos colectados por las abejas manejadas en el NO Patagónico, el
34 comportamiento de forrajeo del abejorro invasor le permite adelantarse en la captación

1 de recursos, pudiendo afectar negativamente la producción de miel. A lo largo de esta
2 tesis encontré que las altas densidades alcanzadas por este abejorro invasor (*Bombus*
3 *terrestris*) en los cultivos de frambuesa está afectando negativamente tanto la calidad de
4 la producción de frutos como la disponibilidad de recursos florales, particularmente
5 néctar, que podrían ser utilizados por las abejas mieleras. Por este motivo, como
6 alternativa a la introducción de especies exóticas, aquí recomiendo la implementación
7 de prácticas de manejo ambientalmente amigables, como bordes naturales rodeando las
8 plantaciones, incrementar la heterogeneidad en los agroecosistemas, reducir el uso de
9 insecticidas, etc, las cuales promueven ensamblajes diversos y estables de polinizadores
10 nativos para garantizar la provisión de servicios de polinización a cultivos.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

Índice

1		
2	Capítulo 1	7
3	Introducción General: la naturaleza mutualista/antagonista de las interacciones planta-	
4	polinizador	7
5	Objetivos Principales.....	18
6	Sistema de estudio	20
7	Capítulo 2.	25
8	Altas frecuencias de visita de abejas incrementan la deposición de polen pero reducen la	
9	calidad de los frutos en frambuesa.	25
10	Resumen.....	26
11	Introducción	28
12	Materiales y métodos	31
13	Resultados	38
14	Discusión	43
15	Material Suplementario del Capítulo 2 (C2).....	48
16	Capítulo 3.	56
17	Modelo mecanicista de los costos y beneficios de la polinización para cultivos:	
18	frecuencia de visita e identidad de polinizadores predicen la calidad de frutos en	
19	frambuesa.....	56
20	Resumen	57
21	Introducción.....	58
22	Materiales y Métodos.....	60
23	Resultados	64
24	Discusión	68
25	Material Suplementario del Capítulo 3 (C3).....	72
26	Capítulo 4.	84
27	El abejorro invasor reduce la disponibilidad de néctar para las abejas mieleras a través	
28	del robo a pimpollos de frambuesa.	84
29	Resumen	85
30	Introducción.....	86
31	Materiales y Métodos.....	88
32	Resultados	94
33	Discusión	99
34	Material Suplementario del Capítulo 4 (C4).....	102

1	Capítulo 5	105
2	Conclusión general	105
3	Agradecimientos	112
4	Bibliografía	113

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

Capítulo 1

1

2

3

Introducción General: la naturaleza mutualista/antagonista de las interacciones planta- polinizador

5

6



7

8

9

10

11

12

13

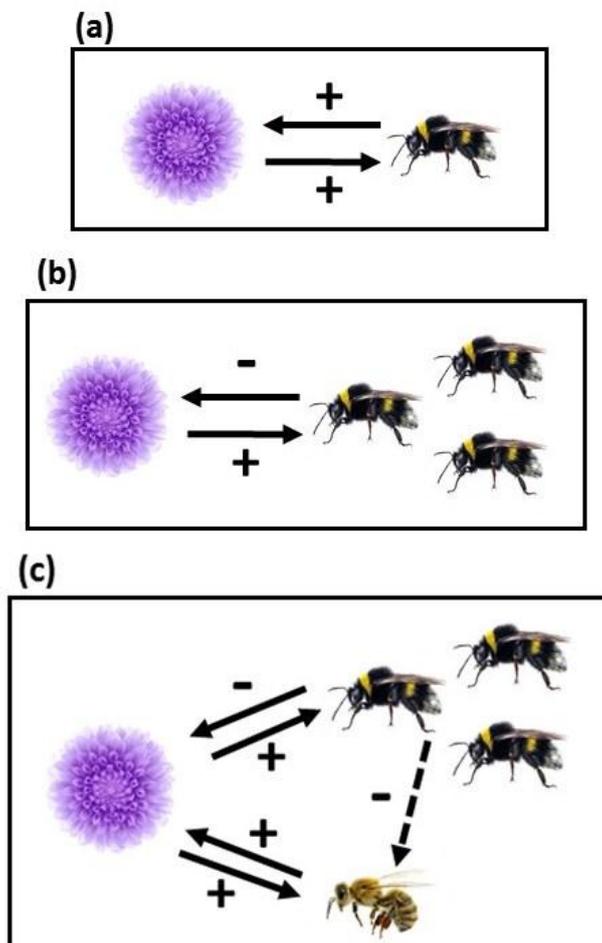
1 La polinización mediada por animales es uno de los mutualismos más estudiados
2 globalmente desde hace más de 250 años. Kölreuter fue la primera persona que
3 introdujo la discusión sobre polinización de flores por insectos en un reporte científico
4 publicado en 1761 (*Voläufige Nachricht*), a partir del cual mucho se ha avanzado en el
5 entendimiento de las interacciones complejas entre plantas y polinizadores. En este
6 mutualismo, el animal visita las flores en búsqueda de recursos alimenticios,
7 principalmente néctar y/o polen, y durante su visita produce la transferencia de polen
8 entre flores. Esta transferencia de polen da lugar a formación de frutos y semillas,
9 permitiendo la reproducción sexual de las plantas con flor. Este mutualismo incluso
10 antecede la aparición de las angiospermas y, aparentemente, los rasgos que lo favorecen
11 han sido una de las causas de la impresionante diversidad de este grupo en la Tierra, ya
12 que actualmente el 87% de las casi 250.000 especies existentes de las plantas con flor
13 dependen de animales para la transferencia de polen y producir semillas (Herrera y
14 Pellmyr 2009; Ollerton et al. 2011). A su vez, miles de especies de invertebrados y
15 cientos de especies de vertebrados dependen de los recursos provistos por las flores para
16 alimentarse y/o alimentar su descendencia (Kearns et al. 1998). De los animales
17 polinizadores, los más importantes son claramente los insectos (e.g. abejas, mariposas,
18 moscas, escarabajos), donde cerca de 290.000 especies han sido reportadas
19 mundialmente como visitantes florales (Nabhan y Buchmann 1997).

20 Los mutualismos de polinización son típicamente generalizados, con la mayoría
21 de las especies de plantas polinizadas por un grupo diverso de animales y la mayoría de
22 los polinizadores recompensados por flores de una variedad de especies de plantas
23 (Waser et al. 1996). Esta naturaleza difusa de los sistemas de polinización facilita el
24 reemplazo de compañeros de interacciones siguiendo la expansión o retracción natural o
25 antropogénica de las áreas de distribución de las especies. Por ello, tanto las plantas
26 exóticas y los visitantes florales transportados lejos de sus áreas de distribución natural
27 pueden beneficiarse de las interacciones con la fauna y flora indígena, respectivamente
28 (Aizen et al. 2008; Ollerton y Watts 2012). Los humanos también nos hemos
29 beneficiado de la naturaleza generalista de este mutualismo cultivando muchas especies
30 dependientes de polinizadores, es decir, aquellas cuya calidad y rendimiento se ven
31 beneficiados en mayor o menor medida por la polinización biótica, fuera de sus áreas
32 naturales (Garibaldi et al. 2013). Adicionalmente, los humanos nos beneficiamos
33 manejando polinizadores generalistas, como lo son las abejas sociales, para la

1 producción de miel y para suplementar el servicio de polinización a cultivos. El clásico
2 ejemplo es la abeja mielera, *Apis mellifera*, originaria de Europa y África, la cual ha
3 sido introducida a América, Australia y muchas islas, y forrajea tanto en cultivos,
4 malezas y vegetación nativa (Villanueva, Gutierrez y Roubik 2004). Más
5 recientemente, la cría y venta de abejorros del género *Bombus* spp., específicamente
6 introducidos para la polinización de ciertos cultivos como tomate, melones, almendros,
7 etc. se ha incrementado mundialmente (Velthuis y van Doorn 2006). Sin embargo, el
8 reemplazo de compañeros, o la inclusión de una nueva interacción, no necesariamente
9 resultan en un mutualismo de similar eficiencia.

10 Las interacciones incluyen tanto beneficios como costos para las especies
11 interactuantes, por lo que la interacción es mutuamente beneficiosa solo si los
12 beneficios exceden los costos para los dos interactuantes (Bronstein 2001; Holland et al.
13 2004; Morris et al. 2010). Por ello, la interacción entre plantas y polinizadores nativos
14 y exóticos exhibe un rango de resultados que van desde altamente beneficiosos hasta
15 altamente perjudiciales, dependiendo de sus historias de vida y rasgos demográficos
16 (Morales y Aizen 2006; Aizen et al. 2008). La sustitución de mutualistas nativos
17 eficientes, por especies exóticas menos eficientes, o incluso antagonistas (e.g.
18 polinizadores legítimos por robadores de néctar o polen), puede ser una causa
19 importante de la disrupción del mutualismo (Goulson 2003; Dohzono y Yokoyama
20 2010). Diferencias en abundancias desproporcionadas entre los interactuantes puede
21 afectar la integridad del mutualismo tanto directamente, determinando un cambio de
22 mutualismo (Fig. 1a) a un antagonismo (Fig. 1b) en la interacción planta-animal, como
23 indirectamente, afectando a otro interactuante (Fig. 1c). Por ejemplo, en Australia, la
24 invasión de *A. mellifera* decreció la producción de semillas de árboles de *Grevillea*
25 *baklyana*, como consecuencia del reemplazo de pájaros nectarívoros que proveían una
26 polinización más eficiente (Vaughton 1996). Incluso el reemplazo de polinizadores
27 taxonómicamente relacionados y funcionalmente equivalentes, como subespecies
28 endémicas de abejorros por la introducción de *Bombus terrestris* en Japón, puede haber
29 reducido el cuajado de frutos de una planta nativa (Kenta et al. 2007). En sistemas
30 agrícolas también se ha demostrado que el manejo activo de abejas domésticas no
31 reemplaza los beneficios de la presencia de ensambles diversos de polinizadores
32 (Garibaldi et al. 2013).

1 **Figura 1.** Efectos directos e indirectos denso-dependientes. (a) En la interacción
 2 planta-polinizador el polinizador tiene efectos directos sobre la planta, es decir, su
 3 compañero de interacción y viceversa. Cuando los animales que visitan las flores
 4 principalmente por comida (típicamente néctar y/o polen) y secundariamente por otros
 5 recursos (e.g. resinas), accidentalmente transfieren polen compatible de las anteras al
 6 estigma de la flor, mejorando el éxito reproductivo, fertilización de óvulos, y
 7 producción de semillas, la interacción es mutuamente beneficiosa. (b) Sin embargo,
 8 cuando las abundancias relativas se vuelven muy desiguales, uno de los interactuantes
 9 (e.g. el visitante floral animal) puede sobreexplotar al otro (e.g. la planta). En este caso,
 10 la interacción permanece beneficiosa para el interactuante más abundante (aunque se
 11 espera una retribución menor para el polinizador por visita), pero se volverá menos, o
 12 incluso perjudicial, para el interactuante menos abundante, si los costos de la interacción
 13 igualan o exceden los beneficios. (c) Una especie de visitante floral con alta abundancia
 14 puede exhibir efectos directos no recíprocos con su interactuante vegetal poco
 15 abundante, también causando efectos negativos indirectos (flecha discontinua) sobre
 16 otro visitante floral poco abundante al disminuir la cantidad de recursos florales.



1 Liberados de muchos procesos reguladores presentes en sus rangos nativos,
2 plantas y polinizadores exóticos pueden alcanzar densidades en sus rangos introducidos
3 que los predispone a sobreexplotar a su nuevo compañero interactuante y competir por
4 el mutualismo con su contraparte nativa (Morales y Traveset 2009). En particular, altas
5 densidades de polinizadores exóticos pueden agravar los costos de la interacción para
6 plantas con baja densidad, cuando esta diferencia en la densidad relativa impone
7 frecuencias de visita extrema (Morris et al. 2010), así como incrementar la competencia
8 por recursos florales y sitios de nidificación con otros visitantes florales (Goulson
9 2003). Mientras que los efectos de la invasión de polinizadores en los sistemas
10 naturales ha sido un tema ampliamente desarrollador en la literatura, sus efectos en los
11 sistemas agrícolas han permanecido por explorados. En esta tesis me focalicé en estos
12 efectos directos e indirectos asociados a los impactos de las invasiones de especies de
13 abejas en los mutualismos de polinización, utilizando un sistema de estudio que incluye
14 una especie cultivada (la frambuesa, *Rubus idaeus*), un abejorro invasor (*Bombus*
15 *terrestres*), y uno exótico domesticado (la abeja mielera, *Apis mellifera*).
16 Específicamente hipotetizo que una interacción planta-animal mutualista cambia en
17 antagonista cuando los interactuantes tienen densidades relativas desproporcionadas.

18 Esta tesis tiene como marco teórico un modelo conceptual focalizado
19 específicamente en los efectos directos e indirectos denso-dependientes de los visitantes
20 florales exóticos en la interacción de polinización aplicada a sistemas agrícolas.
21 Construido sobre argumentos previos (Bronstein 2001; Holland et al. 2004; Morris et al
22 2010), este modelo considera a las interacciones entre planta-polinizador como una
23 relación de costo-beneficio, la cual puede ser mutualista o antagonista, dependiendo de
24 si los beneficios netos (beneficio menos costo) son positivos para ambos interactuantes
25 o negativos para al menos uno de ellos. Luego analicé como los incrementos en la
26 abundancia relativa de uno de los interactuantes cambia el balance entre los costos y
27 beneficios de los interactuantes. Aunque la identificación de los costos-beneficios entre
28 polinizadores y plantas está lejos de ser novedoso (Bronstein 2001), su aplicación para
29 entender las implicancias de la invasión de especies sobre los sistemas naturales y
30 agrícolas nunca se ha desarrollado. El modelo conceptual que aquí planteo tiene
31 relevancia tanto teórica como aplicada, y puede ayudar en manejos de conservación y
32 agricultura.

33 ***Modelo Conceptual***

1 Una interacción es mutualista cuando los beneficios exceden los costos para
2 ambos interactuantes; de otra forma la interacción se vuelve antagonista (Bronstein
3 2001; Holland et al. 2004; Morris et al. 2010). Aunque los beneficios del mutualismo
4 de polinización son obvios, los beneficios máximos de cada interactuante pueden ser
5 limitados por diferentes factores. Para las plantas, la capacidad de tomar ventaja de
6 polinizadores abundantes y eficientes depende tanto del número de óvulo disponibles
7 para fertilizar o de los recursos disponibles para el desarrollo de la semilla, cualesquiera
8 de los dos sea el factor más limitante (Harder et al. 2008). Correspondientemente, la
9 capacidad de un animal de capitalizar recursos florales de una sola especie de planta que
10 esté en alta abundancia depende del tiempo disponible para forrajear (Stephens y Krebs
11 1986), la calidad de los recursos de la planta (Praz et al. 2008) y la disponibilidad y
12 diversidad de otros recursos esenciales (Tasei y Aupinel 2008). Los costos más
13 aparentes y directos para las plantas involucran la producción y mantenimiento de
14 estructuras atractivas y producción de recompensas (Siuthwick 1984; Ashman y Barker
15 1992), y para los animales el tiempo de forrajeo y energía (Stephen y Krebs 1986).
16 Además, tanto la planta como el polinizador experimentan otras costos directos e
17 indirectos relacionados con la interacción en sí, incluyendo daño floral, transmisión de
18 patógenos, e incrementos en la exposición a herbívoros y predadores (Morris et al.
19 2010).

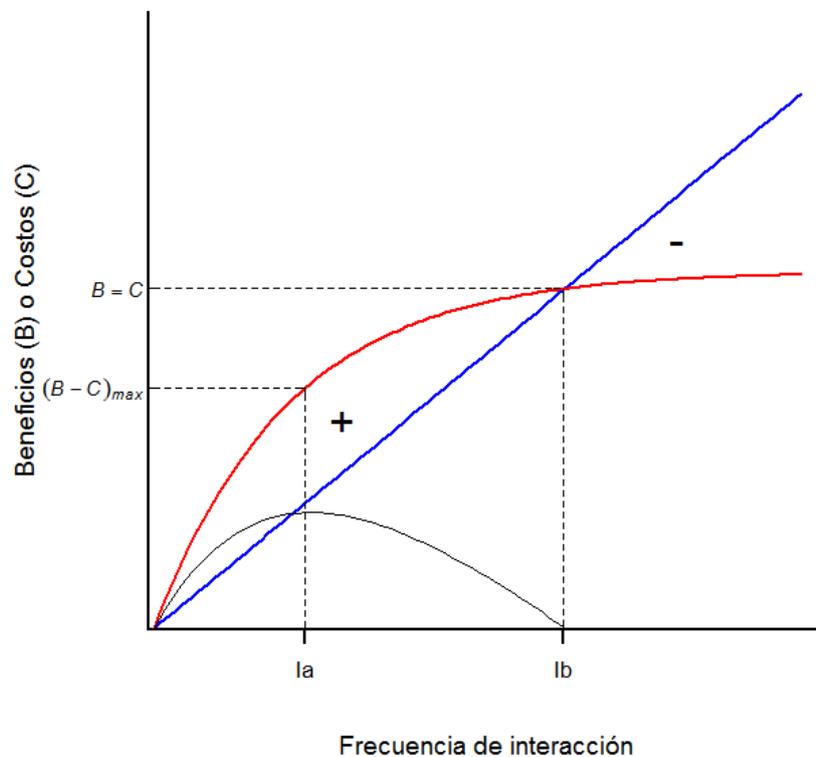
20 Debido a que los beneficios potenciales son limitados, la maximización del
21 *fitness* por ambos interactuantes va a involucrar reducir sus propios costos mientras que
22 aumentan los costos de su interactuante (Bronstein 2001). Por ejemplo, mientras que las
23 plantas se benefician al limitar las recompensas para incrementar la transferencia de
24 polen a través de la reducción de la pérdida de polen y geitonogamia así como
25 incentivar el movimiento de los polinizadores, los polinizadores se benefician a través
26 de minimizar los costos en los movimientos seleccionando plantas con altas
27 recompensas y flores próximas entre sí (Klinkhamer & de Jong 1993; Waser et al.
28 1996). A pesar de los mecanismos existentes para evitar la sobreexplotación del
29 mutualista (Holland et al. 2004), un crecimiento extremo en la densidad de uno de los
30 interactuantes puede cambiar el balance en los costos-beneficios, transformando el
31 mutualismo en un antagonismo (Morris et al. 2010). Desde la perspectiva de la planta,
32 el beneficio neto se maximiza a frecuencias de visita intermedias si los costos se

1 incrementan continuamente con las visitas (Klinkhamer y de Jong 1993; Haarder et al.
2 2001).

3 Para ilustrar este cambio de interacciones mutualistas a antagonistas,
4 consideremos una planta con beneficios totales (B), en términos de semillas producidas,
5 que incrementa asintóticamente con el incremento de las visitas de polinizadores (Fig. 2,
6 curva azul, ver también Aizen y Harder 2007). Esta asíntota existe para la función
7 femenina debido a que el número de óvulos o recursos disponibles para la producción
8 de semillas tiene un límite, mientras que para la función masculina se asume una
9 producción de granos de polen fija. Aunque los costos (C) eventualmente saturan al
10 incrementarse el número de visitas, mayormente debido al agotamiento de recursos
11 (Morris et al. 2010), asumamos por simplicidad que los costos se incrementan
12 linealmente sobre el mismo rango de visitas (Fig. 2, curva roja; ver también Simms y
13 Rausher 1987). Los mutualismos requieren que los beneficios excedan los costos, lo
14 cual es cierto a baja o moderada frecuencia de interacción; sin embargo, debido al
15 efecto diferente que tiene las visitas sobre costos y beneficios, a ciertas frecuencias de
16 visita, los costos de interacción para la planta exceden los beneficios y la interacción se
17 vuelve antagonista (Fig. 2). Aunque los beneficios y costos son medidos en diferente
18 moneda (e.g. producción de semillas vs producción de azúcar, respectivamente, para el
19 caso de las plantas que ofrecen néctar como recompensa e interactúan con polinizadores
20 que forrajean por néctar), los costos incluyen invertir recursos que pueden comprometer
21 el éxito reproductivo actual o futuro vía una reducción en el crecimiento y/o
22 supervivencia (Obeso 2002). Por ejemplo, la remoción continua de néctar, y por lo
23 tanto la inducción de reposición de néctar, en *Blandfordia nobilis*, una planta polinizada
24 por aves, tiene grandes efectos en la producción de semillas, demostrando un
25 compromiso entre B y C (Pyke 1991). En consecuencia, los beneficios netos en
26 términos de contribución de semillas son maximizados [i.e. $(B-C)_{\max}$ en Fig. 2] a la
27 visita (I_a) para la cual la primer derivada de la curva de beneficios iguala la pendiente de
28 la función de costos, mientras que el mutualismo cambia a antagonismo en la
29 frecuencia de interacción (I_b) a partir de donde los costos exceden los beneficios, y por
30 lo tanto, la reproducción cae a cero (Fig. 2 curva negra).

31

1 **Figura 2.** Consecuencias esperadas del incremento asintótico de los beneficios (e.g.
2 producción de semillas potencial; curva roja) y costos crecientes de forma lineal (e.g.
3 daño floral; curva azul) a medida que se incrementa la frecuencia de interacción. Los
4 beneficios netos son maximizados $[(B-C)_{max}]$ en la frecuencia de interacción (I_a) para la
5 cual la tangente (i.e. primer derivada) a la curva de beneficios es igual a la pendiente de
6 la función de costos. Desde la perspectiva de la especie interactuante focal, el
7 mutualismo cambia a antagonismo neto en el valor de la frecuencia de interacción (I_b) a
8 la cual las dos funciones se cruzan ($B = C$). De acuerdo a este modelo, el éxito
9 reproductivo de la planta debería mostrar una relación de forma cóncava con la
10 frecuencia de visita (curva continua negra).



11

12

13 El incremento en los costos de interacción emergentes del “efecto masa”
14 asociados con la invasión de especies predice impactos a diferentes niveles de
15 organización biológica. En lo inmediato, al disminuir los beneficios netos asociados
16 con el incremento de los costos decrece el *fitness* individual. Sin embargo, si este costo

1 se extiende, involucrando muchos individuos, y persiste en el tiempo, podría afectar el
2 éxito reproductivos de las poblaciones tanto silvestres como manejadas.

3 Como las interacciones interespecíficas involucran individuos, sus costos
4 asociados deben ser evaluados primeramente a ese nivel. Para las plantas, los costos
5 fisiológicos de la floración incluyen los costos fijos de la construcción de la flor, el
6 costo diario de mantenerla, y varios posibles costos que tienden a incrementarse con las
7 visitas y, por lo tanto, con la densidad de la especie animal interactuante. Este último
8 podría incluir el costo de la reposición de néctar (Pyke 1991), efectos directos e
9 indirectos de robo de polen y néctar (Hargreaves et al. 2009), y costos relacionados con
10 el daño floral (Traveset et al. 1998). Además, la recepción de cantidades excesivas de
11 polen puede incrementar la competencia de los tubos polínicos, decreciendo la
12 producción de semillas por debajo de lo que resultaría de recibir una cantidad de polen
13 moderada (Young y Young 1992; Harder et al. 2016). La “castración” de flores por
14 hongos parásitos (Antonovics 2005) y reducción en la calidad de néctar como resultado
15 de infecciones (Herrera et al. 2008) son también costos de las interacciones impuestos
16 por la transmisión de patógenos por polinizadores. Es importante tomar en cuenta que
17 diferentes tipos de costos dependientes de la visita pueden ocurrir simultáneamente. Por
18 ejemplo, visitas a *Fuchsia magellanica* por pájaros paseriformes, en vez de colibríes,
19 puede imponer tanto un costo directo vía daño al ovario, e indirecto, a través del robo de
20 néctar y su reposición (Treveset et al. 1998). Incluso el reemplazo de ensamblajes
21 diversos de polinizadores silvestres por abejas mieleras manejadas reduce la producción
22 en cultivos de café (Badano y Vergara 2011)

23 A pesar de la relevancia de esta visión costo/beneficio dependiente de la
24 densidad para la ecología y evolución de las interacciones planta-polinizador, las
25 mismas han sido raramente documentadas. Una excepción la constituye los
26 mutualismos que involucran las larvas de insectos polinizadores que consumen semillas,
27 cuyos efectos positivos (polinización) o negativos (depredación de semillas) dependen
28 de la frecuencia de visitas que determinan tanto la deposición de polen como la cantidad
29 de huevos ovipositados y de larvas que se desarrollan a partir de los mismos (e.g. higos
30 y avispa de higos, *Yucca* y *Tegeticula*; Bronstein 2001; Holland et al. 2004). Según
31 nuestro conocimiento, en ningún caso esta relación costo/beneficio han sido examinado
32 en el contexto de las invasiones biológicas. Por ejemplo, el abejorro de lengua corta
33 *Bombus terrestris* puede ser un polinizador legítimo o uno de los principales robadores

1 de néctar tanto en especies silvestres como cultivadas. De hecho, el incremento en el
2 robo de néctar ha sido documentando en regiones invadidas donde esta especie ha
3 alcanzado altas abundancias (Kenta et al. 2007; Combs 2011, Graham 2015).

4 Es muy probable que las distintas especies de plantas difieran en cuanto a la
5 relación entre costos y la abundancia o la frecuencia de visitas de los polinizadores,
6 dependiendo de sus características florales. Entre las características más obvias, flores
7 robustas, con estilos y filamentos gruesos deberían ser menos susceptibles al daño físico
8 causado por frecuencias de visitas excesivas. Además, la senescencia floral inducida
9 por polinización, la cual es relativamente común en muchas angiospermas (van Doorn
10 1997), podría amortiguar la producción de semillas contra los costos de una alta
11 frecuencia de interacción al acortar el tiempo de exposición de las flores a visitas
12 repetidas al mismo tiempo de permitir una adecuada polinización. Esta respuesta
13 también debería reducir la exposición a enfermedades transportadas por polinizadores,
14 como los períodos de establecimiento de las mismas (Shykoff et al. 1996). Sin
15 embargo, muchas especies de plantas no exhiben estas características, y por lo tanto son
16 más vulnerables a los distintos efectos negativos derivados de frecuencias de visitas
17 extremadamente altas.

18 En teoría, los costos de la interacción planta-polinizador asociados con una
19 super-abundancia de visitantes florales invasores pueden tener consecuencias tanto
20 sobre las poblaciones de plantas silvestres como manejadas, particularmente cuando la
21 producción de semillas decrece lo suficiente como para limitar el crecimiento, o
22 mantenimiento poblacional, o cuando la producción de semillas o frutos de una
23 plantación decrece por debajo de lo producido por autogamia (Turnbull 2000). Aunque
24 hasta el día de no se han evaluado la existencia de estos efectos demográficos o
25 productivos en relación con invasiones de polinizadores, frecuencias de visita excesivas
26 por el abejorro invasor *B. terrestris* podrían estar declinando la producción de semillas
27 en muchas plantas nativas y cultivadas a través de causar daños severos a las flores e
28 incrementar el robo de néctar (Kenta et al. 2007; Combs 2011). Estas consecuencias
29 podrían ser evaluadas comparando la producción de semillas de poblaciones de plantas
30 o cultivos en sitios no invadidos e invadidos por visitantes florales exóticos.

31 A pesar de que los polinizadores silvestres están declinando globalmente (Potts
32 et al. 2010), algunas especies de abejas introducidas en muchas regiones del mundo para

1 producción de miel o polinización de cultivos se han vuelto invasores excepcionalmente
2 exitosos, alcanzando abundancias no observadas en sus regiones nativas (Goulson 2003;
3 Stout y Morales 2009). Una de esas especies es la abeja mielera africanizada, *Apis*
4 *mellifera scutellata*, la cual monopoliza muchos recursos florales en el Neotropico,
5 particularmente en bosques tropicales y subtropicales fragmentados (Vital et al. 2012).
6 Por ejemplo, visitas de esta abeja a las inflorescencias de *Proposis nigra* en pequeños
7 fragmentos del bosque Chaqueño exceden las visitas de todos los otros insectos en casi
8 12 veces (Aizen y Feinsinger 1994). Otro reconocido polinizador es el mencionado
9 *Bombus terrestris*, un abejorro de lengua corta nativo de Eurasia y Africa del Norte que
10 está siendo criado comercialmente y ha sido introducido intencionalmente para la
11 polinización de cultivos en Japon, Nueva Zelanda, Sud América y Tasmania. Esta
12 especie ha sido liberada en campos de palta en 1997 en Chile, invadiendo el Noroeste de
13 la Patagonia, Argentina, durante 2006, y se sigue expandiendo hacia el Sur y Este del
14 continente (Morales et al. 2013). Su abundancia actual en Patagonia es al menos tres
15 veces la abundancia previa de su casi extinto congénere, *Bombus dahlbomii*, el único
16 abejorro nativo de del Sur de Chile y Argentina (Morales et al. 2013). Como
17 consecuencia, la arvejilla nativa *Vicia nigricans* recibe numerosas visitas y exhibe a
18 altas tasas de robo por parte de este abejorro exótico, reduciendo su éxito reproductivo
19 en comparación con sitios donde este abejorro tiene menor incidencia (Graham 2015).

20 Estas abundancias extremas de los invasores *A. mellifera* y *B. terrestris* pueden
21 paradójicamente incrementar la abundancia total de abejas, y por lo tanto la frecuencia
22 de visita a las flores, comparado con las condiciones previas a la invasión,
23 incrementando acumulativamente los costos de interacción. Aunque ambas especies
24 pueden afectar la polinización, altas frecuencias de visita pueden reducir el éxito
25 reproductivo vía incremento del robo de polen (Hargreaves et al. 2009), robo de néctar
26 (Kenta et al. 2007) y daño floral (Combs 2001). Por esta razón, la comprensión de los
27 impactos que han tenido las invasiones de polinizadores, originalmente introducidos
28 para polinizar cultivos, sobre la calidad del servicio de polinización brindado, así como
29 sus efectos sobre los polinizadores manejados para la obtención de miel, nos brindará
30 valiosa información sobre las consecuencias que trajo aparejado una de las prácticas
31 agrícolas más empleadas mundialmente durante los últimos años.

32
33

Objetivos Principales

En esta tesis estudié los efectos de la frecuencia de visitas del abejorro invasor *Bombus terrestris* y la abeja mielera *Apis mellifera* sobre la calidad del servicio de polinización brindado a los cultivos de frambuesa (*Rubus idaeus*) de la Comarca Andina del Paralelo 42°. El marco conceptual que utilicé es considerar las interacciones entre planta-polinizador como una relación de costo-beneficio, la cual puede ser mutualista o antagonista, dependiendo de si los beneficios netos son positivos o negativos. A su vez, estudié cómo la invasión del abejorro *B. terrestris* afecta la disponibilidad de recursos florales (i.e. néctar) para la abeja mielera *A. mellifera*. En primera instancia (*Capítulo 2*) evalué los efectos denso-dependientes de la frecuencia de visita de polinizadores sobre la calidad del servicio de polinización (i.e. en términos de beneficios (deposición de polen) y costos (daño flora)) y calidad de frutos en cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus*). Posteriormente (*Capítulo 3*), realicé un modelo estocástico, el cual integra las funciones que describen los procesos de beneficio (deposición de polen) y costos (daño floral) de las interacciones entre polinizadores y plantas, así como los procesos post-polínicos (i.e. carga polínica mínima para gatillar la germinación del polen, tiempo de desarrollo y crecimiento de tubo polínico hasta fecundar óvulo), así como los nivel de autogamia, dando como resultado la calidad de frutos esperados bajo distintas densidades e identidades de polinizadores. Finalmente (*Capítulo 4*), estudié cómo la densidad de abejorros exóticos modifica la disponibilidad de recursos ofrecidos por el cultivo de frambuesa para la abeja mielera (*A. mellifera*) a través del robo de néctar en pimpollos.

A continuación, detallaré los objetivos particulares de cada capítulo:

Capítulo 2. Altas frecuencias de visita de abejas incrementan la deposición de polen pero reducen la calidad de los frutos en frambuesa.

1. Evaluar si la frecuencia de visita a flores afecta el número de granos de polen depositados en los estigmas de frambuesa, y si este efecto puede diferir entre estos los dos principales visitantes florales (i.e. *Bombus terrestris* y *Apis mellifera*).

- 1 2. Evaluar si las abejas dañan los estilos de la flor durante su visita, si este daño
2 puede diferir entre los dos principales visitantes florales, y si la intensidad del
3 daño varía con la frecuencia de visitas.
- 4 3. Evaluar si el número de granos de polen por estigma afecta el número de drupas
5 por fruto.
- 6 4. Evaluar si el número de estilos dañados por flor afecta el número de drupas por
7 fruto.

8 ***Capítulo 3. Modelo de costos y beneficios de la polinización para cultivos: frecuencia***
9 ***de visita e identidad de polinizadores predicen calidad de frutos en frambuesa.***

- 10 1. Llevar a cabo de una serie de experimentos de campo dirigidos a estimar
11 parámetros claves e identificar funciones que describan los diferentes procesos
12 de la polinización y post-polinización que determinan el número de drupas por
13 fruto.
- 14 2. A partir de esta información, desarrollar un modelo estocástico que permita
15 identificar un servicio de polinización óptimo, en términos de frecuencia de
16 visita e identidad de polinizadores, que maximice la calidad de frutos en cultivos
17 de frambuesa.

18 ***Capítulo 4. El abejorro invasor reduce disponibilidad de néctar para las abejas***
19 ***mieleras a través del robo a pimpollos de frambuesa***

- 20 1. Evaluar si la abundancia e identidad de visitantes florales (abejorros o abejas)
21 afecta la intensidad de robo de néctar en pimpollos de frambuesa.
- 22 2. Evaluar si el robo en pimpollos afecta la producción y reposición de néctar en
23 las flores.
- 24 3. Estimar cuánto puede afectar el robo a pimpollos la disponibilidad de recursos
25 para la abeja mielera.

26

27

28

1 **Sistema de estudio**

2 *La Comarca Andina*

3 El NO Patagónico presenta numerosos valles de montaña con características
4 climáticas y edáficas favorables para la producción de “fruta fina”, categoría que
5 incluye frutales mayores como la cereza y la guinda, y cultivos hortícolas como la
6 frutilla y arbustivos como frambuesa, grosellas, y arándanos, entre otros (IICA 2012).
7 La frambuesa (*Rubus idaeus*) comienza a cultivar en la región en la década del '50, y
8 representa el cultivo de fruta fina más importante en superficie cultivada en la región
9 (Martinez 2009; IICA 2012). La principal zona productiva se encuentra ubicada en La
10 Comarca Andina del Paralelo 42°, la cual comprende los poblados de El Bolsón, Lago
11 Puelo, El Hoyo y sus alrededores. Las superficies de las plantaciones de frambuesa
12 suelen tener entre 0.1 y 2 ha. Aunque la Comarca Andina es considerada una zona
13 agrícola de relevancia a nivel país en la producción de fruta fina, se encuentra rodeada
14 de bosques y matorrales naturales del Parque Nacional Lago Puelo y otras áreas de
15 conservación. Estas características hacen que los cultivos se encuentren en una matriz
16 de grandes extensiones de hábitats naturales, lo que favorecería el servicio de
17 polinización por parte de polinizadores silvestres.

18 *La frambuesa*

19 *Rubus idaeus* es una Rosaceae nativa de Europa y Norte de Asia, que se cultiva
20 por sus frutos. De la raíz en forma de rizoma nacen los vástagos de ciclo bianual,
21 dándose la floración y fructificación al segundo año, para el caso de las variedades no
22 re-florecentes, y al primer y segundo año, para el caso de las variedades re-
23 florecientes. En su estado silvestre, la frambuesa es auto-incompatible, dependiendo
24 exclusivamente de una polinización biótica para producir frutos (Jennings 1988). Sin
25 embargo, esta característica se perdió a través del proceso de domesticación, por lo que
26 las variedades cultivadas actuales son todas auto-fértiles (Jennings 1988). A pesar de
27 esta característica, la estructura de la flor (numerosos pistilos alrededor de un núcleo)
28 impide una auto-polinización completa (ver Figura 3). Particularmente, el polen del
29 anillo de anteras periférico no contacta los pistilos ubicados en la parte más céntrica de
30 la misma flor sin la ayuda de algún vector animado (Cane 2005). Por ello, aunque la
31 mayoría de las flores de frambuesa forman fruto en ausencia de polinizadores, las flores
32 no visitadas forman frutos mal formados (i.e. con menos drupas) y de menor peso que

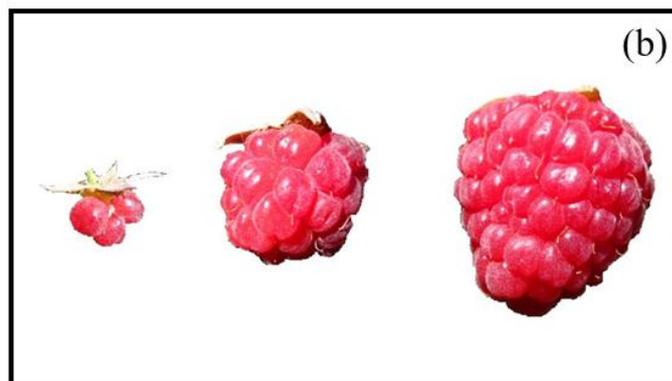
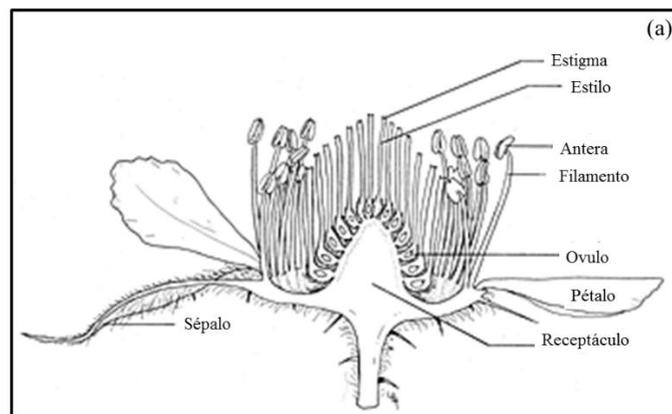
1 las flores que recibieron visitas de polinizadores (Chagnon et al. 1991; Morales 2009,
2 Ramos 2012). Específicamente, se ha observado que en ausencia total de visitantes
3 florales el peso y la cantidad de drupas por fruto decrecen entre un 10 y 40 % (Chagnon
4 et al. 1991; Cane 2005; Morales 2009). Aunque los requerimientos de polinización no
5 son muy altos, existe un manejo activo de colmenas de abejas o abejorros para
6 incrementar la producción de frutos de calidad comercializable, recomendándose 2
7 colmenas por ha (Chagnon, Gingras & Oliveira 1991; Cane 2005; Velthuis & van Doorn
8 2006; Lye et al. 201).

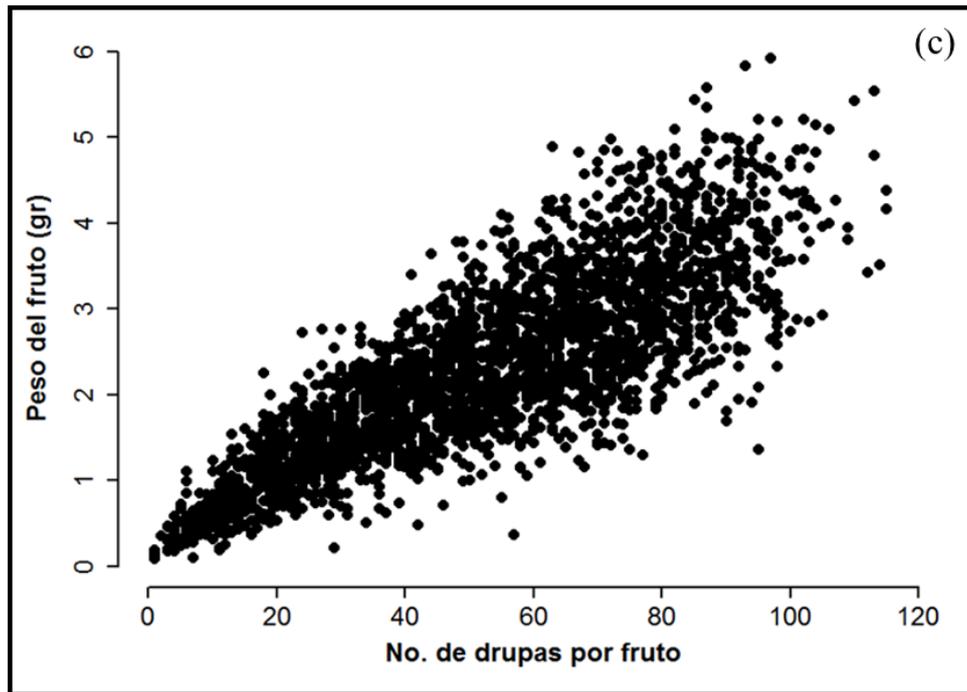
9 Estudios previos mostraron que las flores abiertas (de fácil acceso), con copiosa
10 producción de néctar, y polen de alta calidad nutricional, hacen a la frambuesa muy
11 atractiva para los polinizadores (Free 1993; Schmidt et al. 1987). Numerosas especies
12 de abejas silvestres han sido descritas como polinizadores adecuados para la frambuesa
13 (Hippa et al. 1981; Hansen y Osgood 1983; Whitney 1984; Pelletier et al. 2001).
14 Estudios particulares con abejorros del género *Bombus* sp. y abejas mieleras mostraron
15 que ambos visitantes florales son buenos polinizadores de la frambuesa, necesitándose
16 entre 8-20 visitas para que el fruto alcance su máxima calidad (Chagnon et al. 1991;
17 Willmer et al. 1994; Morales 2009; Lye et al. 2011).

18 La flor de la frambuesa es multipistilar y cada uno de los 80-110 estilos de la
19 flor se encuentra unido a un ovario con un único óvulo, el cual desarrollará una drupa si
20 es correctamente fertilizado (ver Fig. 3a). El fruto de la frambuesa es una polidrupa
21 (Fig. 3b), la cual se cosecha de forma manual desprendiendo el agregado de drupas del
22 receptáculo. Cuando se desarrolla cerca del máximo número de drupas, que está
23 determinado por el número de ovarios, el fruto adquiere buen tamaño y forma (e.g.
24 buena calidad, ver Ramos 2011), manteniéndose unido el agregado de drupas una vez
25 cosechado. Esto hace que los frutos puedan ser vendidos como IQF (“Individual Quick
26 Frozen”) alcanzando su máximo valor comercial. Cuando el número de drupas por
27 fruto disminuye, comienzan a aparecer malformaciones, perdiéndose calidad y
28 desarmándose el agregado de drupas cuando el fruto es cosechado. Esto hace que los
29 frutos de baja calidad sean cosechados para pulpa, disminuyendo el valor comercial de
30 los mismo. A su vez, dado que la cantidad de drupas presenta una altísima correlación
31 con el peso del fruto (Fig. 3c) al mismo tiempo que se pierde calidad se está perdiendo
32 producción.

1 En la región del NO Patagónico se cultivan numerosas variedades de frambuesa
2 como, Schönemann, Tullameen, Glen glova, Heritage, Himbo top y Autumn bliss, entre
3 otras. Se diferencian, principalmente, en que las tres primeras no son re-florecentes
4 (i.e. producen una floración al año) y las últimas tres son re-florecentes (i.e. doble
5 floración). En esta tesis se trabajó durante las tres temporadas de muestreo con la
6 variedad Autumn bliss por ser ampliamente la más cultivada, y se muestreó,
7 particularmente, la floración del vástago nuevo (i.e. enero-marzo) por ser la más
8 importante a nivel productivo (i.e. representando el 70 % de la producción total).

9 **Figura 3.** Importancia de la visita de polinizadores a las flores de frambuesa sobre la
10 calidad de los frutos. (a) Detalle de flor de frambuesa en corte longitudinal (modificado
11 de McGregor 1976). (b) Frutos de frambuesa de distintas calidades. (c) Relación entre
12 el número de drupas por fruto y su peso individual en gramos (gr) de los 3000 frutos
13 analizados.





1

2

3 *Los visitantes florales*

4

5 La región cuenta con un importante número de apicultores, los cuales manejan
 6 las colmenas principalmente para la obtención de miel. Los apicultores suelen colocar
 7 colmenas próximas a cultivos de frambuesa, debido a que sus flores son muy
 8 productoras de néctar con alto contenido de azúcar (Haragsimova-Neprasova 1960;
 9 Simidchiev 1976). De hecho, análisis palinológicos recientes de muestras en miel de la
 10 Comarca Andina del Pararelo 42° muestran al néctar de especies del género *Rubus*
 11 como el principal recurso colectado por las abejas mieleras (Morales, sin publicar). La
 12 cantidad de colmenas colocadas en las cercanías de los cultivos de frambuesa no se
 13 realiza por estimaciones previas sobre área cultivada y número de colmenas necesarias
 14 dependiendo de los requerimientos del cultivo, sino que depende más de si el productor
 15 agrícola da permiso o no al apicultor para colocar las colmenas dentro de su predio.
 16 Esto hace que algunas plantaciones no tengan colmenas mientras que otras incluyan más
 de 20/ha cultivada.

17

18 Esta región presenta una altísima abundancia del abejorro invasor *Bombus*
 19 *terrestris*, el cual fue reportado por primera vez en la Patagonia Argentina en 2006
 20 luego de ser introducido en Chile para la polinización de cultivos en 1997 (Torretta,
 Medan & Abrahamovich 2006). Actualmente, este abejorro es el visitante floral más

1 abundante, y un robador de néctar de muchas especies de plantas nativas y exóticas en
2 Patagonia (Morales et al. 2013; Schmid-Hempel et al. 2014; Geslin & Morales 2015).
3 Más aún, este abejorro ha sido observado robando néctar de pimpollos de frambuesa a
4 través de agujeros generados en los sépalos, tomando los recursos incluso antes que
5 estos estuviesen siendo ofrecidos (Sáez obs. personal). Además de ser un excelente
6 oportunista para coleccionar recursos, la invasión de abejorro trajo aparejada la drástica
7 declinación nivel regional del único abejorro nativo *Bombus dahlbomii* (Arbetman et al.
8 2012; Morales et al. 2013).

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

Capítulo 2.

Altas frecuencias de visitas de abejas incrementan la deposición de polen pero reducen la calidad de los frutos en frambuesa.



El contenido de este capítulo fue publicado como:

Sáez A., Morales C.L., Ramos L.Y. & Aizen M.A. (2014). Extremely frequent bee visits increase pollen deposition but reduce drupelet set in raspberry. *Journal of Applied Ecology*, 51: 1603-1612.

DOI: 10.1111/1365-2664.12325

1 **Resumen**

2 La producción de muchos cultivos con flor se ve beneficiada por alta diversidad
3 y abundancia de polinizadores. Sin embargo, una relación inversa entre abundancia de
4 polinizadores y producción puede resultar si las abejas, a pesar de transferir polen,
5 perjudican la cantidad o calidad de los frutos o semillas, por ejemplo, a través de daño
6 floral durante las visitas. Aquí evalué la polinización y el número de drupas por fruto
7 en 16 campos de frambuesa (*Rubus idaeus*) a lo largo de un gradiente de abundancia de
8 abejas en el NO de la Patagonia, Argentina. Usando suplementación de polen en un sub
9 grupo de 6 campos, también se evaluó si el número de drupas se encontraba limitado
10 por polen. Observé que la abeja mielera (*Apis mellifera*), la cual proviene
11 principalmente de colmenas manejadas, y el abejorro invasor (*Bombus terrestris*)
12 realizaron el 50 y 45 %, respectivamente, de todas las visitas de abejas (i.e. superfamilia
13 Apoidea) a las flores de frambuesa. La cantidad de polen depositada en los estigmas se
14 vio incrementada con la frecuencia de visita de todas las abejas en conjunto y,
15 particularmente, con las visitas de *A. mellifera*, pero no con las de *B. terrestris*. El
16 número de drupas por fruto no se encontró limitado por polen a lo largo del gradiente de
17 abundancia de abejas, ni mostró relación con la cantidad de polen depositado en los
18 estigmas. En cambio, el número de drupas se redujo con el aumento en la proporción
19 de estilos dañados, lo cual se encontró más relacionado con la frecuencia de visita de *B.*
20 *terrestris* que con la de *A. mellifera*. En campos con las frecuencias de visita de abejas
21 más altas ($\sim 300 \text{ visitas} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$) ~ 80 % de los estilos de las flores se encontraban
22 dañados y éstas desarrollaron frutos con ~ 30 % menos drupas en comparación con las
23 flores de los campos con la menor frecuencia de visita ($\sim 4 \text{ visitas} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$). Aquí
24 muestro cómo visitas extremadamente frecuentes a las flores de frambuesa,
25 particularmente las de *B. terrestris*, dañan los estilos impidiendo la fertilización de los
26 óvulos por el polen depositado y el correspondiente cuajado de drupas. De esta manera
27 se limita la producción en cantidad y calidad de este cultivo, al reducir el número de
28 drupas por fruto. Debido a que solo algunas visitas de abejas (~ 15) son requeridas para
29 maximizar la producción de frutos en plantas frambuesa, el manejo de polinizadores en
30 el NO de la Patagonia debería focalizarse particularmente en reducir la abundancia del
31 abejorro invasor *B. terrestris* y, secundariamente, en el control del número de colmenas
32 de abejas mieleras cercanas a los campos cultivados. Aunque las prácticas de manejo
33 tradicionales dependen del supuesto que más visitas incrementan linealmente la

1 producción de frutos y/o semillas, altas frecuencias de visita pueden ser perjudiciales
2 para el desarrollo de frutos y, consecuentemente, para la producción de cultivos.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **Introducción**

2 El área destinada a la producción de cultivos dependientes de polinizadores ha
3 incrementado durante los últimos 50 años (Aizen et al. 2008; Aizen y Harder 2009;
4 Garibaldi et al. 2001), mientras que la diversidad y abundancia de polinizadores
5 silvestres se ha reducido en muchas regiones, principalmente debido a la expansión e
6 intensificación agrícola (Potts et al. 2010). En combinación, estas tendencias
7 contrastantes tienen el potencial de ser perjudicial para la producción mundial de
8 alimentos a largo plazo, debido a que incrementos en la limitación polínica podrían
9 decrecer la producción de los cultivos dependientes de polinizadores (Kremen y
10 Ricketts 2000; Holden 2006; Garibaldi et al. 2011; Bommarco et al. 2012). El conflicto
11 entre requerimientos de polinización y la intensificación agrícola podría ser mitigado a
12 través del manejo activo de polinizadores, lo cual muchas veces implica la introducción
13 de abejas domesticadas para suplementar el servicio de polinización provisto
14 gratuitamente por las abejas silvestres que habitan en los remanentes de hábitats
15 naturales y semi-naturales adyacentes a los cultivos. La abeja mielera (*Apis mellifera*)
16 ha sido históricamente manejada principalmente para la producción de miel, y más
17 recientemente también para la polinización de cultivos, pero en las últimas tres décadas
18 algunas especies de abejorros (*Bombus spp.*) están siendo criadas y vendidas
19 específicamente para brindar servicios de polinización (Velthuis y van Doorn 2006).

20 Aunque la introducción de polinizadores comerciales más allá de sus áreas de
21 distribución nativa para la polinización de cultivos pudo haber incrementado la
22 producción de alguno de ellos (ver Velthuis y van Doorn 2006 y referencias ahí;
23 Southwick y Southwick 1992), estas introducciones han resultado en algunos de los
24 mayores eventos de invasión de polinizadores (Dafni et al. 2010). Además de las
25 consecuencias negativas sobre las abejas nativas (Goulson 2003; Morales et al. 2013), la
26 calidad del servicio de polinización que estas especies invasoras proveen ha sido
27 cuestionado (Vergara 2008). De hecho, estas invasiones pueden haber resultado en una
28 abundancia inusualmente alta de visitantes florales particularmente adaptados a
29 ambientes disturbados de gran escala como son la mayoría de los agroecosistemas. A
30 primera vista, un incremento en la disponibilidad de polinizadores es esperado que
31 incremente la polinización y, consecuentemente, el rendimiento de cultivos limitados
32 por polen (Velthuis y van Doorn 2006 y referencias allí). Sin embargo, como he
33 planteado en la introducción, la interacción planta-polinizador implica beneficios y

1 costos denso-dependientes. Así, un número de visitas excesivamente alto a las flores
2 pueden ser perjudiciales para el cuajado de frutos y/o semillas si los polinizadores dañan
3 la flor durante sus visitas, o si una deposición excesiva de polen conlleva a una
4 saturación del estilo durante el crecimiento de los tubos polínicos (Young 1988; Young
5 y Young 1992; Morris et al. 2010). Dados estos efectos opuestos, la suposición
6 simplista que incrementar la densidad de abejas, a través de la introducción de abejas
7 manejadas, va a promover la producción de cultivos debe ser evaluada para comprender
8 en profundidad las consecuencias a corto y largo plazo de estas prácticas de manejo
9 (Steffan-Dewenter 2003).

10 El cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus*) se beneficia por la visita de
11 polinizadores (Crane y Walker 1984; Cane 2005; Morales 2009). Cada uno de los 70-
12 90 pistilos de la flor multicarpelar puede desarrollar una drupa si es correctamente
13 polinizado. La flor de frambuesa desarrolla un fruto agregado conocido como
14 polidrupa. Para asegurar la producción de frutos de calidad comercial, la mayoría de los
15 óvulos deben estar fertilizados (Cane 2005). A pesar de ser completamente auto-fértil,
16 la producción de frutos bien formados depende completamente de la polinización
17 animal (Cane 2005; Morales 2009, Ramos 2012). Por lo tanto, colmenas de abejas
18 melíferas o abejorros son comúnmente utilizadas en los campos de frambuesa para
19 asegurar una polinización adecuada (Velthuis y van Doorn 2006).

20 Los valles del NO Patagónico son apropiados, tanto climática como
21 edáficamente, para la producción de diferentes cultivos conocidos genéricamente como
22 “fruta fina”, que incluye a la frambuesa, el cual es el cultivo más importante de la región
23 (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos 2006; Instituto Interamericano
24 de Cooperación para la Agricultura 2012). En esta región, actualmente la polinización
25 de la frambuesa depende mayormente de dos especies de polinizadores no-nativos, la
26 abeja mielera manejada y el abejorro invasor *Bombus terrestris* (Morales 2009). *Apis*
27 *mellifera* fue introducida en Patagonia por colonizadores Europeos hace más de un siglo
28 y ha sido reportado como uno de los principales visitantes florales de la frambuesa en
29 nuestra región (Morales 2009). Aunque este polinizador se ha naturalizado, su
30 abundancia local está positivamente asociada con hábitats disturbados (Morales y Aizen
31 2002) y con la presencia de colmenas manejadas (ver resultados). Por otro lado, *B.*
32 *terrestris* llegó a Patagonia en 2006 (Torreta et al. 2006), luego de ser introducido en
33 Chile para la polinización de cultivos. Actualmente, en el NO de la Patagonia, este

1 abejorro es al menos un orden de magnitud más abundante que el único abejorro nativo
2 *B. dahlbomii* y que otro abejorro previamente introducido (*B. ruderatus*), además de ser
3 un visitante floral frecuente de muchas especies de plantas nativas y exóticas (Morales
4 et al. 2013). Sin embargo, en el NO Patagónico, la abundancia de *B. terrestris*, así
5 como la de muchos otros invertebrados, fue reducida drásticamente luego de la erupción
6 del volcán Puyehue en 2011 (Buteler et al. 2011; Morales et al. 2014), lo que generó un
7 fuerte gradiente espacial inverso de abundancia de abejorros y abejas nativas en
8 asociación con el incremento del espesor de la capa de ceniza acumulada (Morales et al.
9 2014).

10 Debido a que la introducción de abejas domesticadas para suplementar el
11 servicio de polinización provisto por polinizadores nativos se está volviendo cada vez
12 más frecuente (Velthuis y van Doorn 2006), los eventos de invasión también se han
13 vuelto cada vez más frecuentes (Goulson 2003; Stout y Morales 2009). Por lo tanto, la
14 evaluación de la efectividad de esta práctica de manejo y de sus involuntarias
15 consecuencias para la polinización y producción de cultivos deberían ser temas de
16 investigación prioritarios. Particularmente, la introducción de abejas y su consiguiente
17 invasión puede crear situaciones de superabundancia de abejas que podrían reducir los
18 beneficios de la polinización debido al incremento de los costos de la interacción (e.g.
19 daño floral) (Young 1988; Young y Young 1992; Morris et al. 2010). En este Capítulo
20 incluyo los resultados de un estudio enfocado en las consecuencias de la variación
21 espacial de la frecuencia de visita de la abeja manejada *Apis mellifera* y del abejorro
22 invasor *Bombus terrestris* en la deposición de polen, daño floral y producción de frutos
23 en campos de frambuesa. Específicamente, busqué respuestas a las siguientes
24 preguntas: (i) ¿Puede la frecuencia de visita a flores afectar el número de granos de
25 polen depositados en los estigmas de frambuesa, y puede este efecto diferir entre estos
26 dos principales visitantes florales?, (ii) ¿Pueden las abejas dañar los estilos de la flor
27 durante su visita, y puede este daño diferir entre los dos principales visitantes florales?,
28 (iii) ¿Puede afectar el número de granos de polen por estigma el número de drupas por
29 fruto? Y, finalmente, (iv) ¿Puede afectar el número de estilos dañados por flor el
30 número de drupas por fruto? Siendo más general, aquí investigué si el costo de la
31 interacción puede exceder los beneficios a altas frecuencias de visita y, por lo tanto,
32 afectar negativamente la producción de cultivos.

33

1 **Materiales y métodos**

2 *Cultivo de estudio*

3 La frambuesa (*Rubus idaeus*), Rosaceae es un arbusto de zonas templadas que se
4 cultiva por sus frutos (Crane y Walker 1984). A pesar de ser completamente auto-fértil,
5 la estructura de las flores de frambuesa (numerosos pistilos en el centro de la flor) no
6 permite una autopolinización autónoma (o espontánea) completa. Específicamente, el
7 polen del anillo periférico de anteras no puede contactar los pistilos centrales de la
8 misma flor en ausencia de un vector de polen (Cane 2005). Por ello, aunque la mayoría
9 de las flores de frambuesa pueden formar fruto independientemente de la visita de
10 abejas, las flores no visitadas forman una mayor cantidad de frutos malformados (i.e.
11 con menos drupas) en comparación con flores que recibieron visitas (Morales 2009,
12 Ramos 2012). Como hemos dicho, colmenas de abejas mieleras y abejorros son
13 comúnmente emplazadas en campos de frambuesa para incrementar la producción de
14 frutos de calidad comercializable, principalmente a través del incremento del número de
15 drupas por fruto (Chagnon et al. 1991; Cane 2005; Velthuis y van Doorn 2006; Lye et
16 al. 2011).

17 *Área de estudio y sitios muestreados*

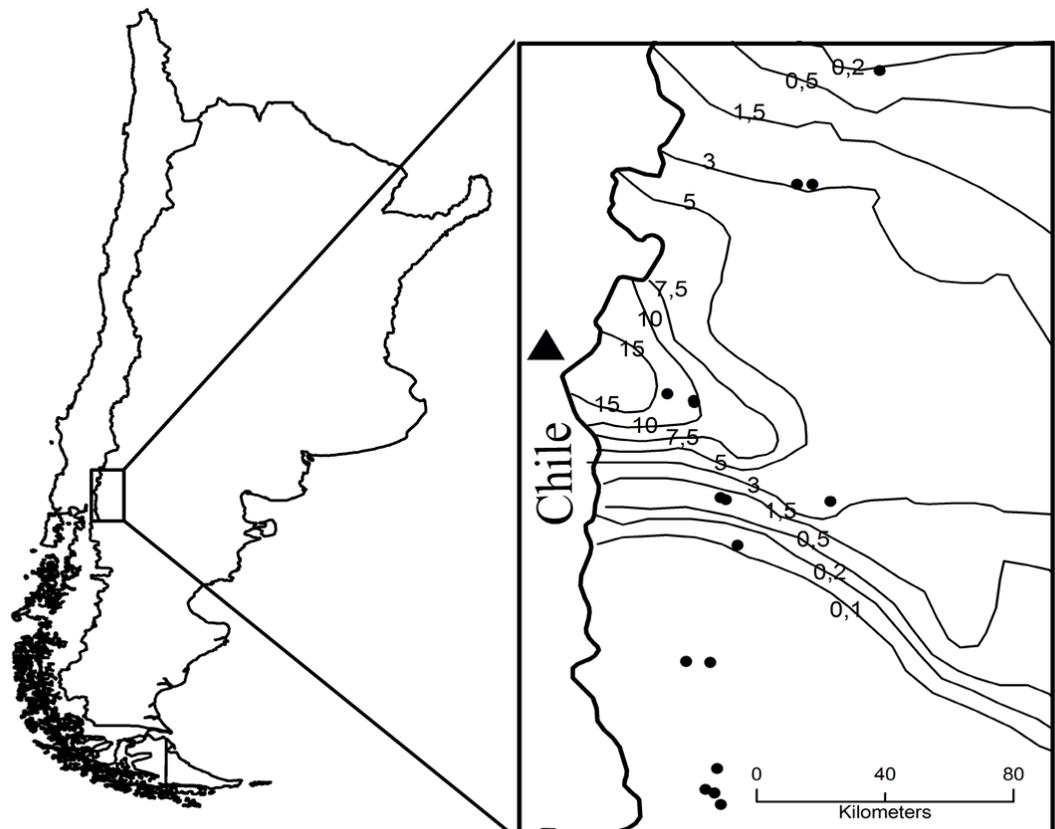
18 El trabajo de campo fue llevado a cabo durante el verano del 2012 (de Enero a
19 Marzo) en 16 campos de frambuesa localizados en el NO de la Patagonia, Argentina.
20 Cada plantación está rodeada de grandes extensiones de hábitats naturales,
21 principalmente bosques del dominio Sub-antártico (Cabrera 1976). Estos campos se
22 encuentran distribuidos sobre una superficie de 1000 km², cubriendo un rango de
23 elevación de 300 a 1400 m, y todos cultivados con la variedad Autumn bliss, la cual
24 produce dos picos de floración por temporada. La precipitación anual promedio entre
25 los campos muestreados varía en promedio entre 650 a 1500 mm y las temperaturas
26 medias anuales entre 7 y 10.4 °C (Hijmans et al. 2005). La superficie cultivada de los
27 campos muestreados varió, aproximadamente, ente 0.05 a 0.5 hectáreas. Todos los
28 campos eran manejados orgánicamente, con sistemas de riego y fertilizados
29 periódicamente. Las distancias entre los campos muestreados siempre fue mayor a
30 1km, promediando 94.5 km, excediendo la distancia de forrajeo promedio esperada de
31 las mayoría de las abejas sociales (Walther-Hellwing y Frankl 2000; Steffan-Dewenter
32 y Kuhn 2003; Osborne et al. 2008) (Fig. 1). Por lo tanto, cada campo puede ser

1 considerado una réplica independiente en cuanto a su fauna de abejas presente en cada
2 uno de ellos.

3 Como consecuencia de la erupción del volcán Puyehue en Junio del 2011, una
4 gran parte del área de estudio fue cubierta por ceniza volcánica (Gaitán et al. 2011), la
5 cual tiene propiedades insecticidas (Buteler et al. 2011; Fernandez-Arhex et al. 2013;
6 Martinez et al. 2013). El grosor de la capa de ceniza depositada varió entre 0 y 13 cm
7 entre los distintos campos muestreados (Fig. 1). Por lo tanto, este evento generó un
8 fuerte gradiente decreciente de abejorros y abejas nativas a medida que aumentaba el
9 grosor de la capa de ceniza (Morales et al. 2014, ver Apéndice C2-1).

10

11 **Figura 1.** Región de estudio en el NO Patagónico, Argentina, incluyendo las
12 localizaciones de los 16 campos de frambuesa (puntos negros). Las isolíneas ilustran la
13 variación en el grosor (cm) de la capa de ceniza depositada luego de la erupción del
14 volcán Puyehue (triángulo negro) en 2011 en la vecina región de Chile.



15

16

1 *Muestreo de campo*

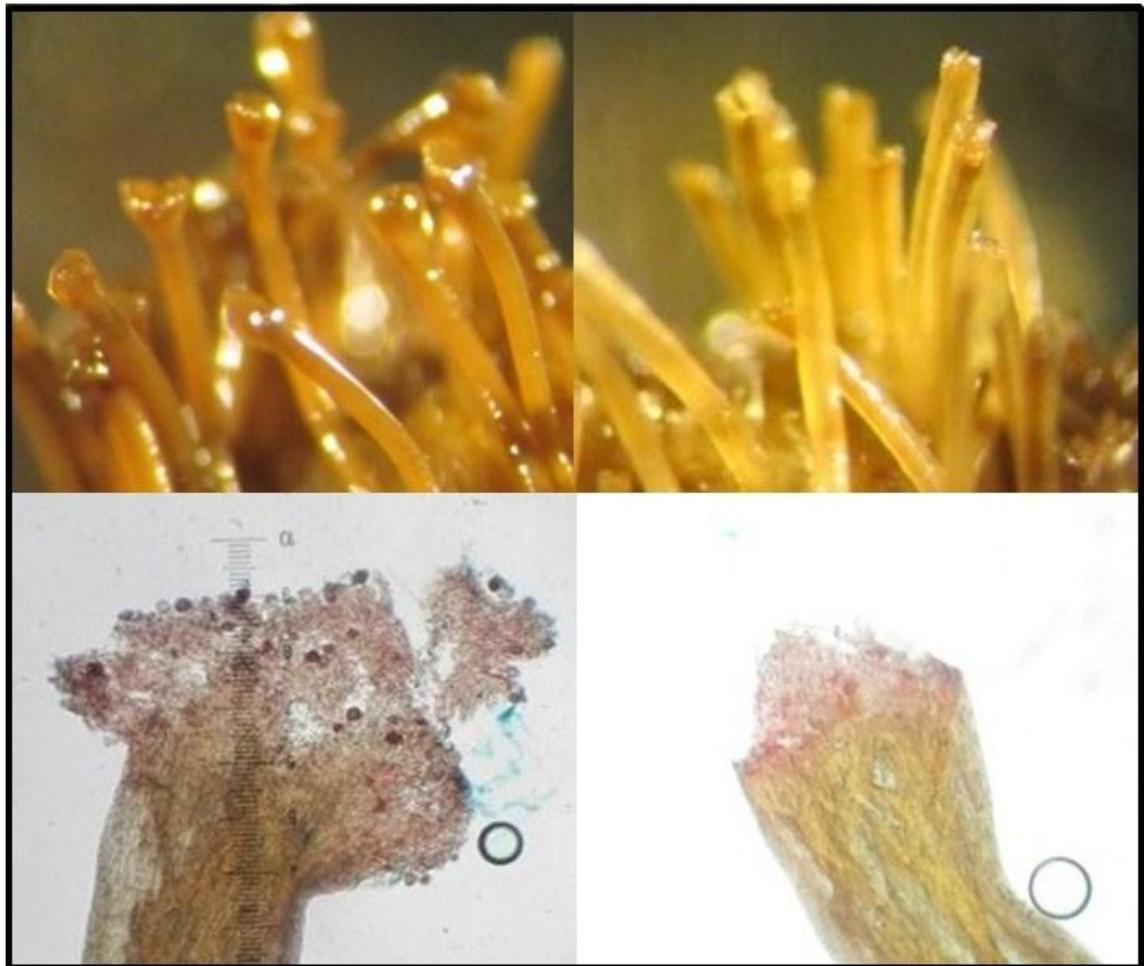
2 En cada campo, realicé 20 censos de polinizadores de 5 minutos cada uno,
3 durante los cuales registré e identifiqué los visitantes florales y el número de flores
4 visitadas por cada individuo a un par de tallos de frambuesa vecinos (separados por < de
5 20 cm). Debido a la variación natural del número de flores abiertas por tallo, el número
6 de flores observadas por censo varió entre 4 y 10 (promedio \pm SD = 6.4 \pm 1.8). En cada
7 campo, cada censo involucró un par de tallos diferentes seleccionados aleatoriamente.
8 Se incluyeron censos en los bordes del cultivo, pero no se evaluaron efectos de borde
9 debido al área limitada de los campos de estudio (ver *Área de estudio y sitios de*
10 *muestreo* arriba). Todos los censos se llevaron a cabo entre las 10:00 y las 18:00 hs,
11 durante días soleados o parcialmente nublados, con poco o nada de viento. Debido a
12 limitaciones de logística, tiempo y la escala geográfica del estudio, los visitantes
13 florales de cada campo fueron muestreados durante un día en el pico de la temporada de
14 floración entre el 11 de enero y el 23 de febrero. Sin embargo, el orden temporal en el
15 cual se muestrearon los campos no siguió ningún gradiente espacial particular. Durante
16 los censos de polinizadores, solo registré los visitantes florales que contactaban las
17 anteras y estigmas de las flores. Los visitantes florales fueron identificados en el campo
18 con la ayuda de una colección de referencia.

19 Para evaluar los efectos de la variación en el número de visitas sobre los
20 beneficios y costos de la interacción, en todos los campos estimé la cantidad de polen
21 depositado en los estigmas y la proporción de estilos dañados. Esto se realizó a partir
22 de la recolección de tres flores senescentes de 10 tallos seleccionados aleatoriamente
23 por campo, los que se guardaron en tubos eppenderoff con una solución de alcohol al
24 70%. En el laboratorio, seleccioné aleatoriamente 5 pistilos de cada flor, los que
25 coloqué sobre un portaobjeto conteniendo solución de Alexander's (Alexander 1980)
26 para finalmente observarlos bajo microscopio a 400x aumentos. Cada pistilo fue
27 clasificado como "no dañado" si el estilo se encontraba intacto y el estigma estaba
28 presente, o "dañado" si el estilo estaba roto y el estigma ausente (ver Imagen 1). A su
29 vez, conté el polen depositado en estigmas de pistilos no dañados. En total, evalué 2400
30 pistilos provenientes de 477 flores.

31

32

1 **Imagen 1.** Imágenes de estilos de frambuesa no dañados (paneles izquierdos) y
2 dañados por abejas (paneles derechos). Las imágenes superiores fueron tomadas bajo
3 lupa (25x), mientras que las inferiores bajo microscopio (100x). En la imagen inferior
4 izquierda se observa parte del estilo y el estigma con polen depositado, mientras que en
5 la imagen inferior derecha se observa parte del estilo y estigma ausente.
6



7
8

9 También evalué la limitación polínica o déficit de polinización, i.e. la limitación
10 en la producción o calidad de frutos debido a que las flores reciben muy pocos granos
11 de polen o granos de polen de calidad insuficiente para maximizar la producción de
12 frutos o semillas, a partir de la suplementación de estigmas de las flores con polen
13 alógamo. Este ensayo fue realizado en seis campos de frambuesa (ver Tabla C2-4),
14 espaciados a lo largo del gradiente de deposición de ceniza y consiguiente abundancia
15 de abejas. Aunque la técnica empleada confunde los componentes de cantidad y calidad

1 del polen asociado con la limitación polínica (Aizen y Harder 2007), no es esperable
2 encontrar limitación por calidad en frambuesa debido a su completa auto-
3 compatibilidad. Por lo tanto, para la frambuesa, la suplementación de polen es un
4 protocolo apropiado para la estimación de limitación de polen por cantidad (Aizen y
5 Harder 2007). A partir de estos experimentos, comparé el número de drupas por fruto
6 de 40 flores polinizadas libremente vs. 40 flores polinizadas libremente suplementadas
7 con polen cruzado (Ashman et al. 2004) de 10 tallos aleatoriamente seleccionados de
8 cada plantación. La suplementación se realizó en los mismos tallos donde, al mismo
9 tiempo, etiquetamos flores polinizadas libremente para controlar por variación
10 individual entre tallos. La suplementación de polen se realizó durante el mismo día que
11 visitamos la plantación para desarrollar los censos de polinizadores. El polen utilizado
12 para realizar la suplementación fue colectado de flores de al menos cinco tallos del
13 mismo campo diferentes a los utilizados para evaluar el cuajado de frutos. Cada flor
14 experimental fue marcada con una etiqueta de papel para la posterior cosecha del fruto
15 correspondiente.

16 Aproximadamente cuatro semanas luego del muestreo de los visitantes florales,
17 recolecté todos los frutos maduros de 10 tallos seleccionados aleatoriamente en 12 de
18 los 16 campos de frambuesa, totalizando 451 frutos (i.e. entre 30 y 60 frutos por
19 campo), y de los frutos de las flores experimentales del tratamiento de limitación
20 polínica. Todos los frutos fueron cosechados en el mismo estado de maduración (i.e.
21 cuando la polidrupa se desprende fácilmente del receptáculo y cada drupa tiene un color
22 rojo oscuro), transportados hacia el laboratorio en una heladera electrónica y
23 conservados en freezer. Usé una lupa (20x) para contar el número de drupas por fruto y
24 una balanza electrónica para pesarlos. El número de drupas por fruto presentó una
25 fuerte correlación con el peso del mismo ($r = 0.77$, $n = 387$, $t = 24.3$, $P < 0.001$) (ver
26 Capítulo 1, Figura 3c), lo cual determina la calidad comercial del fruto (Milivojevic et
27 al. 2011). Sin embargo, en esta tesis analicé la cantidad de drupas ya que esta variable
28 no sólo define mejor el tamaño del fruto sino también su forma.

29 *Análisis de datos*

30 Evalué la influencia de la frecuencia de visita en el número de granos de polen
31 depositados por estigma, la proporción de estilos dañados y el número de drupas por
32 fruto. Para analizar estas variables utilicé modelos lineales generalizados mixtos

1 (GLMM) debido a la naturaleza discreta de las mismas y la estructura jerárquica del
2 diseño de muestreo (i.e. medidas repetidas de flores y frutos por campo pero sólo un
3 valor de frecuencia de visita) (Pinheiro y Bates 2000; Gelman y Hill 2007). Todos los
4 modelos incluyeron “campo” como factor aleatorio, mientras que los análisis del
5 número de drupas como variable respuesta también incluyeron al “tallo” dentro del
6 “campo”, siguiendo la estructura anidada del diseño de muestreo. Los supuestos de los
7 distintos modelos fueron puestos a prueba mediante análisis gráficos de los valores
8 residuales vs predichos. Todos los modelos cumplieron con los supuestos de linealidad,
9 y con las relaciones esperadas de varianza y media de acuerdo a la naturaleza de las
10 variables dependientes y distribuciones del error. A su vez, no encontré evidencias de
11 autocorrelación espacial en la frecuencia de visitas entre campos luego de tomar en
12 cuenta el efecto de la deposición de ceniza (ver Apéndice C2-2). Todos los modelos
13 fueron implementados con el software estadístico R versión 2.15.1 (R, Development
14 Core Team 2012) usando la función `glmmadmb` (library: `glmmADMB`; Bolker et al.
15 2012).

16 Evalué el efecto independiente de la frecuencia de visita de los dos visitantes
17 florales principales, *A. mellifera* y *B. terrestris*, sobre el número de granos de polen por
18 estigma, la proporción de pistilos dañados y número de drupas por fruto. Utilicé los
19 coeficientes parciales de la frecuencia de visita de *A. mellifera* y *B. terrestris* como
20 medida del efecto relativo de estas dos especies de visitantes florales tanto en la
21 deposición de polen como en la ruptura de pistilos. No evalué el efecto de las abejas
22 nativas debido a que *A. mellifera* y *B. terrestris* explicaron el 95% de todas las visitas a
23 las flores de frambuesa en el área (ver resultados). Para los análisis del número de
24 granos de polen depositados por estigma y número de drupas por fruto asumí una
25 distribución binomial negativa, con una función de enlace *ln* (ver tabla C2-5). Para los
26 análisis de la proporción de estilos dañados asumí una distribución beta-binomial con
27 una función de enlace *logit*. Ambas distribuciones convergen a las distribuciones de
28 Poisson y Binomial, respectivamente, en ausencia de sobredispersión (Bolker 2008).
29 Los análisis del número de drupas por fruto incluyeron los efectos de la deposición de
30 polen en estigma y proporción de estilos dañados como variables predictoras.

31 También evalué si el número de drupas por fruto estaba limitado por
32 polinizadores, y si el grado de limitación variaba a lo largo del gradiente de abundancia
33 de abejas. Para ello, evalué el efecto del tratamiento de polinización (i.e.

1 suplementación de polen vs. flores naturalmente polinizadas), frecuencia de visita y su
2 interacción sobre el número de drupas por fruto. La variable respuesta fue modelada
3 asumiendo, nuevamente, una distribución binomial negativa (ver Tabla C2-5).

4 Realicé un análisis de vías para evaluar los efectos de beneficios vs. costos de la
5 frecuencia de visita en el número de drupas por fruto. En el primer modelo de vía
6 propuse que la frecuencia de visita de *A. mellifera* y *B. terrestris* afectan el número de
7 drupas positivamente a través de un incremento en la cantidad de polen depositado en
8 los estigmas, y negativamente a través del incremento del daño a los estilos (Fig 2, A).
9 El ajuste del modelo a los datos fue llevado a cabo usando el modelo propuesto por
10 Shipley (2009), el cual, a diferencia del SEM (Structural Equation Modelling) clásico
11 permite considerar la estructura jerárquica de los datos y variables que siguen diferentes
12 distribuciones. Aplicando este método, primero se identificaron todas las posibles
13 relaciones independientes “k”, las cuales están representadas por pares de variables no
14 conectadas directamente por una flecha y que, por lo tanto, es de esperar que sean
15 estadísticamente independientes luego de controlar por el efecto de cualquier variable
16 causal directa en el diagrama de vía propuesto (Shipley 2009). Luego analicé cada
17 relación separadamente ajustando un GLMM, asumiendo para cada variable respuesta la
18 distribución y función de enlace descritas arriba (ver Tabla C2-5). Para cada relación
19 se obtuvo la probabilidad (p_i) de que la variable X no tenga efecto directo sobre Y , luego
20 de haber condicionado por todas las variables con efectos directos. Finalmente, las
21 probabilidades (p_i) de todas las relaciones se combinaron de acuerdo a la función:

22
$$C = -2 \sum_{i=1}^k \ln(p_i).$$

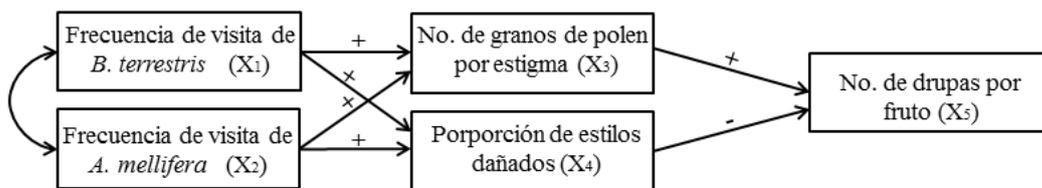
23 Luego puse a prueba si el valor C difería significativamente de lo esperado por azar a
24 través de su comparación con una distribución X^2 con $2k$ grados de libertad (Shipley
25 2009).

26

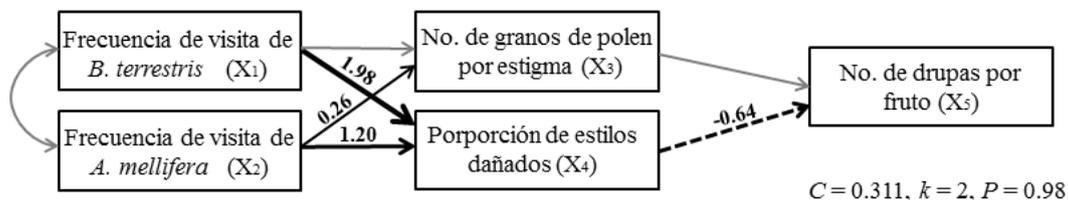
27 **Figura 2.** Modelo conceptual puesto a prueba mediante análisis de vías (a y b, pre- y
28 post- test, respectivamente), mostrando la secuencia hipotetizada de los efectos de las
29 visitas de los visitantes florales más importantes a las flores de frambuesa, *Bombus*
30 *terrestris* (X_1) y *Apis mellifera* (X_2), en la deposición de polen en estigmas (i.e. número

1 de granos de polen depositados por estigma) y daño floral (i.e. proporción de estilos
 2 dañados) (variables X_3 y X_4 , respectivamente), y sus efectos en el número de drupas por
 3 fruto (X_5). (a) Modelo conceptual a ser testeado. Las flechas uni-direccionadas
 4 representan efectos directos, y las bi-direccionadas representan correlaciones entre pares
 5 de variables. Los símbolos (+,-) asociados con las flechas indican los efectos esperados
 6 (positivos o negativos, respectivamente) en la variable respuesta. (b) Resultados del
 7 análisis de vías del modelo conceptual testeado, donde las flechas continuas y
 8 entrecortadas indican efectos positivos y negativos, respectivamente, mientras que las
 9 flechas grises indican efectos no significativos. El grosor de la línea indica la magnitud
 10 del efecto (los coeficientes de regresión parcial significativos se encuentran sobre la
 11 flecha).

(a) Modelo conceptual a ser testeado



(b) Modelo conceptual testeado



12

13

14 **Resultados**

15 Se registraron un total de 3216 visitas de abejas a las flores de *R. idaeus*. *Apis*
 16 *mellifera* y *Bombus terrestris* realizaron el 50 y 45 % de todas las visitas de abejas,
 17 respectivamente, mientras que las abejas nativas (principalmente *Cadeguala albopilosa*,
 18 *Ruizantheda próxima* y otras especies de las familias *Colletidae* y *Halicitidae*)
 19 realizaron el restante 5%. La frecuencia total de visitas observadas varió fuertemente
 20 entre campos, en un rango de 0.01 a 3.13 visitas · flor⁻¹ · 5 min⁻¹. Considerando cada
 21 grupo por separado, esta frecuencia varió de 0 a 2.24 visitas · flor⁻¹ · 5 min⁻¹ para *A.*
 22 *mellifera*, de 0.01 a 2.33 visitas · flor⁻¹ · 5 min⁻¹ para *B. terrestris*, y de 0 a 0.45 visitas ·

1 flor⁻¹·5 min⁻¹ para las abejas nativas. Las visitas de *A. mellifera* dependieron del tipo de
2 manejo (i.e. presencia o no de colmenas), mientras que las visitas de abejorros y abejas
3 nativa varió negativamente con la cantidad de ceniza depositada (ver Apéndice C2-1).

4 Como se esperaba, el número de granos de polen promedio por estigma aumentó
5 con el incremento de la frecuencia de visita de todas las abejas combinadas (estimado \pm
6 SE = 0.17 ± 0.06 , $P = 0.01$) (Fig. 3, Tabla C2-5). En promedio, las flores de los campos
7 con las frecuencias de visita más elevadas recibieron 60% más granos de polen que
8 aquellos campos con las frecuencias de visita más bajas, aumentando de ~ 30 a 50
9 granos de polen por estigma. Específicamente, la deposición de polen en los estigmas
10 aumentó significativamente con el incremento de la frecuencia de visita de *A. mellifera*
11 (coeficiente de regresión parcial \pm SE = 0.26 ± 0.09 , $P = 0.004$), pero no con la de *B.*
12 *terrestris* (coeficiente de regresión parcial \pm SE = 0.12 ± 0.1 , $P = 0.22$) (Fig. 3, Tabla
13 C2-5). Por ello, la variación en la deposición de polen está más relacionada a la
14 variación en las visitas de *A. mellifera* que a las de *B. terrestris*.

15 La proporción de estilos dañados se incrementó con el aumento de la frecuencia
16 de visitas totales (estimado \pm SE = 1.48 ± 0.22 , $P < 0.001$) (Fig. 3, Tabla C2-5). En
17 promedio, $\sim 80\%$ de los estilos se encontraban dañados en las flores de campos con las
18 frecuencias de visita más altas, mientras que casi todos los estilos se encontraban
19 intactos en los campos con las frecuencias de visita más bajas. En particular, la
20 proporción de estilos dañados varió positivamente con la frecuencia de visitas de *A.*
21 *mellifera* (coeficiente de regresión parcial \pm SE = 1.2 ± 0.32 , $P < 0.001$), pero lo hizo
22 más fuertemente con la frecuencia de visitas de *B. terrestris* (coeficiente de regresión
23 parcial \pm SE = 1.98 ± 0.34 , $P < 0.001$) (Fig. 3, Tabla C2-5). Por este motivo, aunque los
24 dos visitantes florales producen daño floral, *B. terrestris* es aparentemente más
25 perjudicial que *A. mellifera*.

26

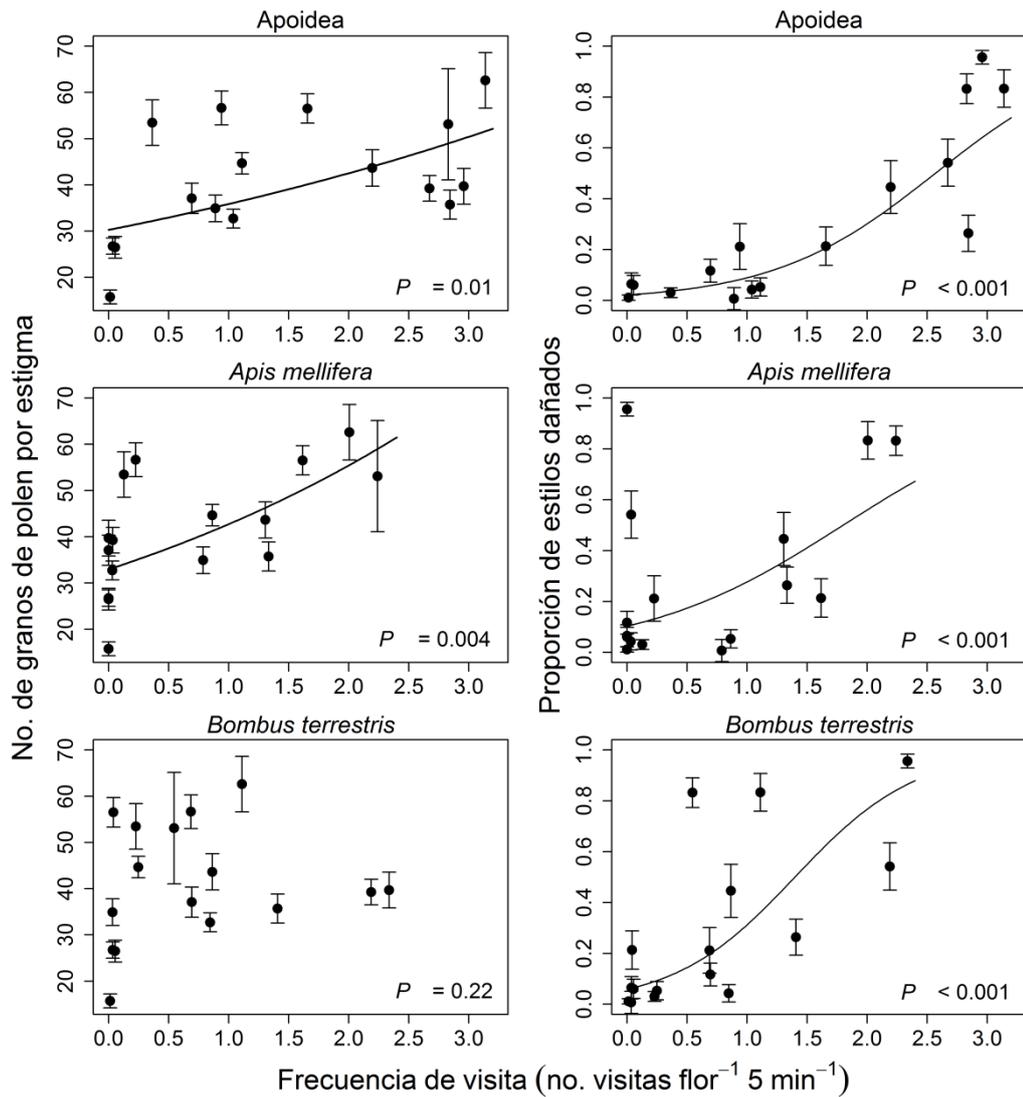
27

28

29

30

1 **Figura 3.** Relaciones de la deposición de polen (paneles de la izquierda) y daño floral
 2 (paneles de la derecha) promedios (\pm SE) con la frecuencia de visita de todos los
 3 Apoidea (paneles superiores), *Apis mellifera* (paneles intermedios), y *Bombus terrestris*
 4 (paneles inferiores). Las líneas indican las relaciones predichas por los modelos lineales
 5 generalizados mixtos que consideraron una distribución binomial negativa para la
 6 deposición de polen y una distribución beta-binomial para el daño floral.

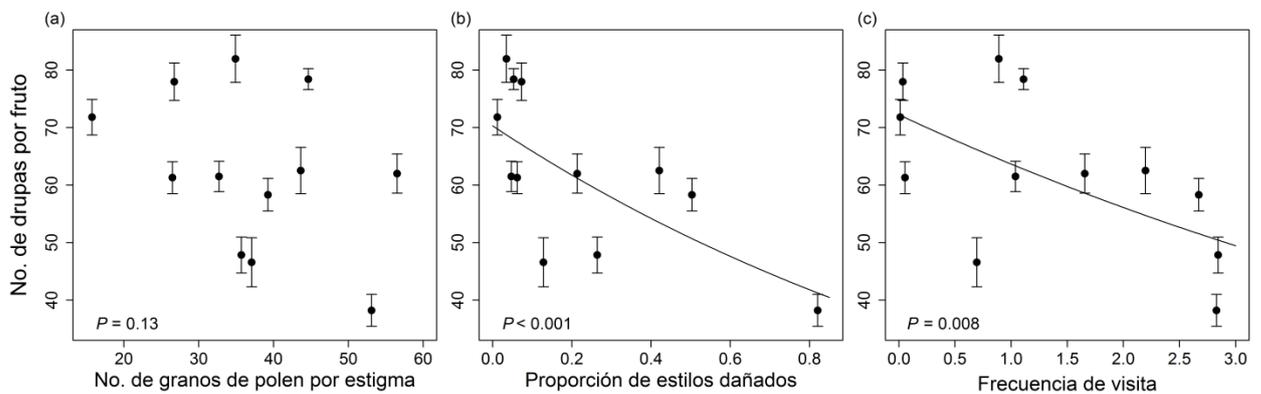


7

8 El número de drupas por fruto no varió significativamente con la cantidad de
 9 polen depositado en los estigmas (estimado \pm SE = 0.007 ± 0.005 , $P = 0.13$) (Fig 4a,
 10 Tabla S2), pero sí estuvo negativamente relacionado con la incidencia de daño a los
 11 pistilos (estimado \pm SE = $-0.64 \pm 0.1,8$ $P < 0.001$) (Tabla C2-5). Los campos con los
 12 mayores niveles de estilos dañados produjeron, en promedio, 40% menos drupas por
 13 fruto que los campos con los niveles más bajos de daño, decreciendo el número de

1 drupas por fruto de 70 a 40 (Fig 4, b). El número de drupas por fruto también declinó
 2 con la frecuencia de visitas totales (estimado \pm SE = -0.12 ± 0.04 , $P = 0.008$) (Tabla C2-
 3 5). Los campos con frecuencias de visitas más elevadas produjeron, en promedio, 30%
 4 menos drupas que los campos con menos frecuencia de visitas, decreciendo de 70 a 50
 5 drupas por fruto (Fig 4c). Específicamente, el número de drupas por fruto varió
 6 negativamente con la frecuencia de visitas de *A. mellifera* (coeficiente de regresión
 7 parcial \pm SE = -0.12 ± 0.06 , $P = 0.05$) (Tabla S2) y con la de *B. terrestris* (coeficiente
 8 de regresión parcial \pm SE = -0.15 ± 0.07 , $P = 0.04$) (Tabla C2-5). Además, el efecto
 9 negativo de la frecuencia de visitas no difirió entre flores suplementadas con polen y las
 10 polinizadas naturalmente a lo largo del gradiente de abundancia de abejas (estimado \pm
 11 SE = 0.006 ± 0.03 , $P = 0.84$) (Fig. 5). A su vez, no hubo evidencia que la
 12 suplementación de polen incremente el número de drupas por fruto (estimado \pm SE =
 13 0.021 ± 0.05 , $P = 0.69$).

14 **Figura 4.** Relaciones del número de drupas por fruto promedio (\pm SE) con (a) la
 15 deposición de polen en estigma, (b) la proporción de estilos dañados por flor, y (c) la
 16 frecuencia de visita (no. visitas \cdot flor $^{-1}$ \cdot 5 min $^{-1}$) de todas las abejas. Las líneas indican
 17 las relaciones predichas estimadas de los modelos lineales generalizados mixtos con
 18 distribución binomial negativa.

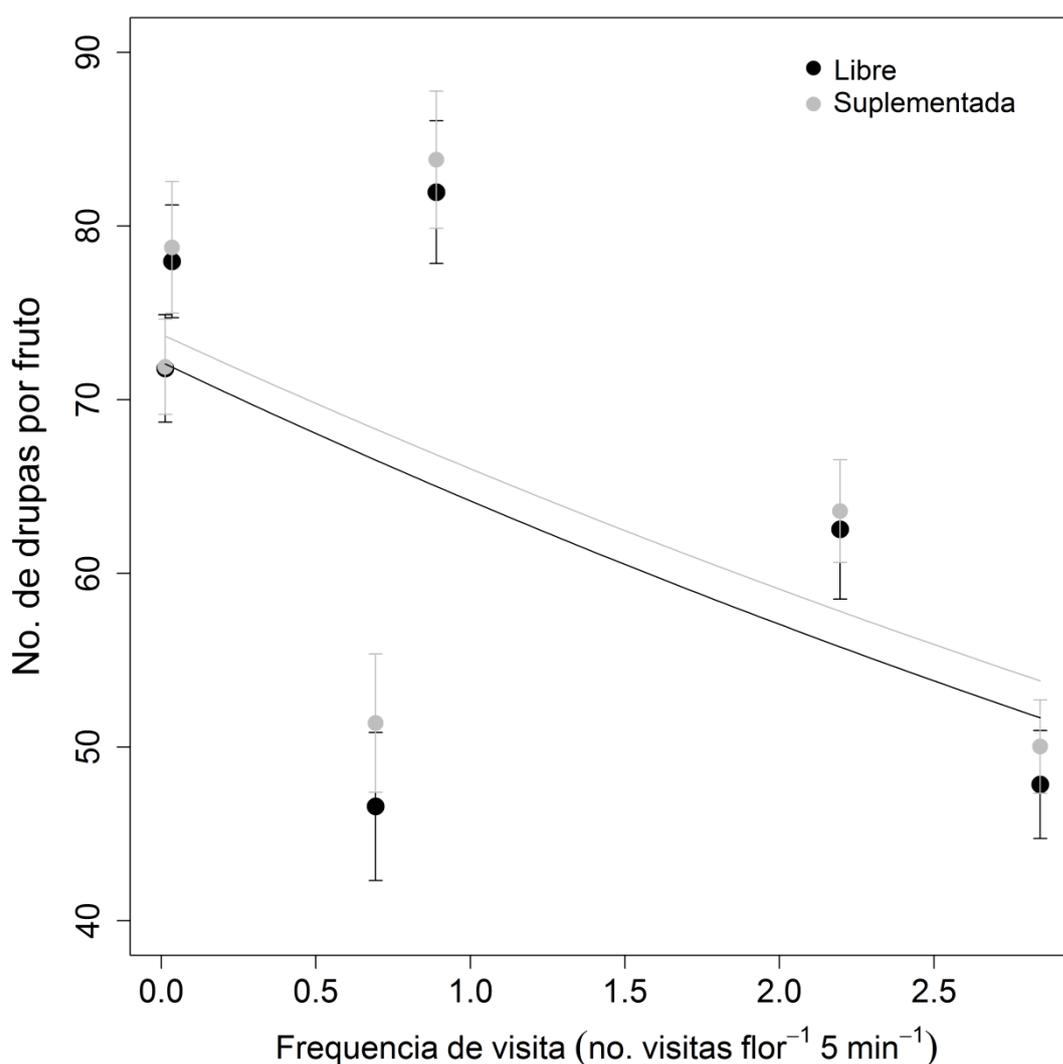


19

20 El modelo conceptual ajustado por análisis de vías explicó los datos
 21 adecuadamente ($C = 0.311$, $k = 2$, $P = 0.98$) (Fig. 2b). La frecuencia de visita promedio
 22 de *A. mellifera* y *B. terrestris* varió independientemente una de otra ($r = 0.15$, $n = 16$, P
 23 $= 0.57$). Las visitas de *A. mellifera* contribuyeron significativamente a la polinización
 24 de la frambuesa a través del incremento de la cantidad de polen depositado, mientras
 25 que las visitas de *B. terrestris* no afectaron la deposición de polen significativamente.
 26 El factor principal responsable en la variación del número de drupas por fruto fue el

1 daño a los estilos, en vez de la deposición de polen, que no tuvo un efecto significativo.
2 Las visitas de ambos, *A. mellifera* y *B. terrestris*, incrementó la proporción de estilos
3 dañados en flores de frambuesa, consecuentemente reduciendo el número de drupas.
4 Sin embargo, este proceso depende más fuertemente de la frecuencia de visita de *B.*
5 *terrestris* que de *A. mellifera*. Por lo tanto, frecuencias de visita excesivas de ambos
6 visitantes florales pueden generar efectos netos perjudiciales en lugar de beneficiosos,
7 aunque *B. terrestris* tiene un efecto negativo más importante que el de *A. mellifera*.

8 **Figura 5.** Efecto de la suplementación manual de polen (suplementación de polen vs
9 flores naturalmente polinizadas) en el número de drupas por fruto (media \pm SE) a lo
10 largo del gradiente de frecuencia de visitas de abejas. Las líneas indican la relación
11 predicha para las suplementadas con polen (gris) y las naturalmente polinizadas (negro)
12 basadas en modelos lineales generalizados mixtos con distribución binomial negativa.



1 **Discusión**

2 Abejas mieleras y abejorros fueron los visitantes florales más importantes en los
3 campos de frambuesa estudiados (ver también Craney Walker 1984; Willmer et al.
4 2008; Morales 2009; Lye et al. 2011), y sus visitas, particularmente aquellas de *A.*
5 *mellifera*, consistentemente aumentaron la deposición de polen en los estigmas de
6 frambuesa. Sin embargo, frecuencias de visita extremadamente altas de *A. mellifera* y,
7 particularmente, del abejorro invasor *B. terrestris* a las flores de frambuesa reducen el
8 número de drupas por fruto y, consecuentemente, la producción a través del daño a los
9 estilos de la flor. Por ello, si consideráramos todo el rango de frecuencia de visitas
10 potenciales, deberíamos esperar que el número de drupas en frambuesa muestre una
11 relación acampanada con la frecuencia de visita de abejas.

12 Las flores de los campos con la menor frecuencia de visita, las cuales recibieron
13 ~10 visitas durante sus 2.5 días de vida (i.e. asumiendo un período de visitas diario de
14 10 hs) recibieron, en promedio, 30 granos de polen por estigma, lo cual parece ser
15 suficiente para fertilizar el único óvulo por carpelo (Ramos 2012). De hecho, este
16 número de visitas concuerda con lo estimado por Chagnon et al. (1991) como la mínima
17 cantidad de visitas para asegurar una adecuada polinización y maximizar la producción
18 y calidad de frutos en frambuesa. Consistente con este punto de vista, el número de
19 drupas no estuvo limitado por polinización, incluso en los campos con las menores
20 frecuencias de visita, indicando que en todos los campos existe una suficiente
21 abundancia de polinizadores para asegurar una adecuada transferencia de polen. Por el
22 contrario, visitas de abejas muy frecuentes pueden dañar las flores de frambuesa,
23 reduciendo el número de drupas por fruto. Las flores de frambuesa de los campos con
24 mayor frecuencia de visita recibieron ~170 y ~140 visitas diarias de *B. terrestris* y *A.*
25 *mellifera*, respectivamente, y la incidencia de daño a los estilos se incrementó
26 fuertemente con la frecuencia de visitas, particularmente con la de *B. terrestris*. De
27 hecho, podemos señalar al daño a los estilos como el principal factor perjudicial del
28 fallo en el número de drupas por fruto luego de haber descartado otros factores
29 asociados con la deposición de ceniza (ver Apéndice C2-2). Este daño podría no tener
30 consecuencias a nivel fruto si ocurriese luego de la fertilización del óvulo; sin embargo,
31 la relación negativa entre el número de drupas y la proporción de estilos dañados indica
32 que este daño ocurre frecuentemente antes de la fertilización (i.e. durante las primeras

1 horas luego de la apertura de la flor). Por ello, la rotura temprana del estilo no estaría
2 permitiendo la llegada de los tubos polínicos al ovario.

3 Morris et al. (2010) reportaron que visitas excesivas a las flores pueden imponer
4 un costo del mutualismo para la planta, decreciendo fuertemente el éxito reproductivo
5 por debajo del máximo posible en el “atamisqui”, una Capparaceae luego de unas pocas
6 visitas de un himenóptero. Similarmente, Young (1988) encontró una relación
7 acampanada, en el éxito reproductivo de una Araceae con la abundancia de escarabajos.
8 Sin embargo, en ninguno de estos casos se han descrito los mecanismos específicos
9 que describían dichos patrones. En la frambuesa, el efecto positivo de la frecuencia de
10 visita en el daño floral, específicamente en el estilo, podría estar determinando un punto
11 óptimo en la frecuencia de visita. Aunque muchos estudios han reportado daño floral,
12 la mayoría han considerado los efectos de visitantes florales no legítimos,
13 específicamente robadores de néctar (Cunningham 1995; Traveset et al. 1998; Kenta et
14 al. 2007), los cuales no transfieren polen efectivamente. En contraste, los dos
15 principales visitantes florales en nuestro estudio, *A. mellifera* y *B. terrestris*, son
16 polinizadores legítimos de la frambuesa, ambos reportados como “eficientes”, estando
17 la frecuencia de visita de la abeja mielera más relacionada a incrementos en la
18 deposición de polen que las visitas del abejorro. En otros estudios de frambuesa, se ha
19 mostrado que visitas esporádicas a las flores por cualquiera de estas dos especies de
20 abejas mejora la calidad de los frutos a través del incremento del número de drupas por
21 fruto (Crane y Walker 1984; Willmer et al. 2008; Lye et al. 2011). Sin embargo, la
22 asociación positiva de daño a los estilos con la frecuencia de visita de estos dos
23 polinizadores, específicamente *B. terrestris*, sugiere la existencia de un óptimo. Este
24 óptimo es el resultado de una relación costo/beneficio que estaría determinada tanto por
25 la deposición de polen como el daño floral que se incrementan con el número de visitas
26 y que varía con la identidad del polinizador. Desafortunadamente, no pude identificar
27 este óptimo en forma empírica, debido a que incluso los sitios con menor frecuencia de
28 visitas recibieron más de 10 visitas durante la vida de una flor, que sería justamente el
29 número de visitas que maximiza la calidad del fruto (ver Chagnon et al. 1991).

30 En ausencia de enemigos naturales y otros factores de regulación, las especies
31 invasoras pueden volverse extremadamente abundantes, alcanzando densidades nunca
32 observadas en sus rangos nativos (Pimentel et al. 2004). Este parece ser el caso de *B.*
33 *terrestris* en el NO Patagónico, donde es actualmente extremadamente abundante

1 (Morales et al. 2013). Asimismo, al mismo momento que ocurre la mayor densidad de
2 abejorros y el pico de floración de esta variedad (Enero-Febrero), lo que ocurre luego del
3 período de floración de la mayoría de las plantas silvestres y cultivadas (Aizen y
4 Vázquez 2006; Morales y Aizen 2006), genera sobreexplotación en las flores por
5 excesivas visitas, excediendo algunas cientos de visitas durante la vida de una flor sólo
6 por esta especie de abejorro. De hecho, en los campos de frambuesa con alta
7 abundancia, los abejorros rompen los sépalos de los pimpollos de frambuesa para
8 alcanzar el néctar, incluso pudiendo dañar estilos antes de la apertura de la flor.
9 Lamentablemente, estimaciones comparables de frecuencias de visita a frambuesa en su
10 rango nativo no están disponibles. Sin embargo, Schulze et al. (2012) estimó la
11 frecuencia de visita en frutillas silvestres y cultivadas, otra Rosaceae con flores
12 multiplistoladas, reportando una frecuencia de visita promedio de $0.07 \text{ visitas} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot 5$
13 min^{-1} , un valor comparable a aquellos observados en los campos de frambuesa con las
14 menores frecuencias de visita. Por esto, las prácticas de manejo deberían focalizarse
15 primero en controlar las poblaciones de este abejorro invasor. Sin embargo, todavía no
16 hay desarrolladas prácticas para manejar abejorros invasores. El desarrollo de dichas
17 prácticas va a estar limitado mientras se siga viendo, desde un punto agronómico, a este
18 abejorro como una especie siempre benéfica y se los siga importando continuamente.

19 Por otro lado, demostré que *A. mellifera* contribuye más eficientemente a la
20 polinización de la frambuesa siendo, a su vez, menos dañina que *B. terrestris*.
21 Diferencias en la colecta de recursos no podrían explicar las diferencias en la eficiencia
22 de los polinizadores, ya que tanto las abejas mieleras como los abejorros forrajeaban
23 principalmente por el néctar de frambuesa. Quizá, diferencias en la eficiencia de la
24 polinización pueden ser atribuidas a una mayor cantidad de polen removido que
25 depositado en los estigmas luego de algunas visitas de *B. terrestris* (Fig. 3; ver Young y
26 Young 1992). Este aparente compromiso entre servicio de polinización y daño de estilo
27 requiere una mayor atención para implementar prácticas de polinización adecuadas. En
28 base a nuestro conocimiento, sin embargo, la densidad de colmenas de abejas mieleras
29 utilizadas en los campos de frambuesa no está basada en criterios agronómicos que
30 consideren relaciones cuantitativas entre producción de frutos y densidad de abejas, sino
31 en criterios apícolas focalizados en la producción de miel. Más aún, como las
32 frecuencias de visitas de *A. mellifera* y *B. terrestris* no estuvieron correlacionadas entre
33 sí, el uso de abejas mieleras es poco probable que reduzca la abundancia local de este

1 abejorro invasor. De hecho, es muy probable que en ausencia de *B. terrestris*, las pocas
2 visitas provistas por el ensamble de polinizadores nativos, junto con un adecuado
3 manejo de abejas mieleras, podrían proveer un adecuado servicio de polinización para
4 maximizar la producción de frutos de calidad comercial en los campos de frambuesa.

5 Aunque menos perjudicial que *B. terrestris*, las visitas de *A. mellifera* también
6 causan daño en los estilos de frambuesa. En un análisis reciente del servicio de
7 polinización en 41 sistemas de cultivos de distintas partes del mundo, Garibaldi et al.
8 (2013) reportaron que las visitas de las abejas mieleras tenían un mayor efecto positivo
9 en la deposición de polen que lo que tenían en la producción de frutos, lo cual fue
10 interpretado como resultado de una alta deposición de polen de baja calidad (i.e. polen
11 propio o del mismo individuo). Nuestros resultados proveen una explicación alternativa
12 para esta aparente inconsistencia entre deposición de polen y producción de frutos que
13 también podría aplicarse a otros cultivos: demasiadas visitas pueden perjudicar la
14 producción de frutos, o calidad de los mismos, a través de un incremento del daño
15 floral, a pesar de incrementar la deposición de polen. Las evidencias presentadas en
16 nuestro estudio abren la necesidad de evaluar en mayor detalle la respuesta de diferentes
17 cultivos a distintas densidades de polinizadores y alentar el uso de especies nativas para
18 la polinización de cultivos a través de prácticas de manejo locales (Carvalho et al.
19 2011, 2012; Garibaldi et al. 2013) antes que la introducción de especies exóticas. Esto
20 contribuirá a prevenir futuros eventos de invasión y, consecuentemente, la
21 sobreexplotación de las flores.

22 La polinización animal es necesaria para aumentar y sostener la producción de
23 diversos cultivos (Klein et al. 2007; Aizen et al. 2008). Mientras que la diversidad de
24 polinizadores se está reduciendo a nivel mundial, la demanda global de alimentos
25 dependientes de polinizadores se está incrementando (Aizen y Harder 2009; Garibaldi et
26 al. 2013). Aunque la introducción de polinizadores ha disminuido el déficit de
27 polinización y aumentado la producción de muchos cultivos (Velthuis y van Doorn
28 2006 y referencias allí, Southwick y Southwick 1992), este estudio en frambuesa provee
29 una perspectiva novedosa en relación a las actuales preocupaciones sobre la declinación
30 global de polinizadores y consecuente crisis de polinización, la cual no siempre
31 distingue entre pérdida de especies y de diversidad y reducciones en la abundancia de
32 polinizadores. Claramente ilustra que un exceso, en vez de un déficit, de visitantes
33 florales asociados a la invasión de una especie de abejorro y un incorrecto manejo de de

1 colmenas de abejas mieleras pueden reducir la producción de cultivos. Dado que
2 muchas especies de polinizadores, además de *A. mellifera*, están siendo criadas a escalas
3 industriales, y siendo introducidas a casi todos los continentes para la polinización de
4 cultivos, nuestros resultados muestran la posibilidad de efectos negativos en la
5 producción agrícola además de los impactos negativos que producen en la fauna de
6 abejas nativas (Goulson 2003; Morales et al. 2013). Hasta que la incidencia y severidad
7 de estas prácticas con efectos perjudiciales para la producción de cultivos sea evaluada
8 en otras especies cultivadas, extrema precaución debería tenerse cuando estas prácticas
9 de manejo son adoptadas.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1	Material Suplementario del Capítulo 2 (C2).	
2		
3	Apéndice C2-1. Efectos de la ceniza en la frecuencia de visita de abejas y posibles	
4	efectos confundidos en set de drupas.....	49
5	Apéndice C2-2. Análisis de auto-correlación espacial.....	52
6	Figura C2-3. Efectos de la deposición de ceniza sobre la frecuencia de visita de	
7	abejas.....	53
8	Tabla C2-4. Características de los campos de frambuesa estudiados.....	54
9	Tabla C2-5. Modelos de regresión.....	55
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		

1 **Apéndice C2-1.** Efectos de la ceniza en la frecuencia de visita de abejas y posibles
2 efectos confundidos en el número de drupas por fruto.

3 La erupción del volcán Puyehue en Junio del 2011 depositó en el suelo una capa
4 de ceniza de entre 0 y 13 cm de espesor a lo largo de los sitios muestreados (ver Figura
5 1 en texto principal y Tabla C2-4). La ceniza impactó negativamente en la fauna de
6 invertebrados (Buteler et al. 2011, Martínez et al. 2013, Fernandez-Arhez et al. 2013),
7 generando un gradiente espacial de abundancia de abejas (Morales et al. 2014). En esta
8 tesis demuestro un decrecimiento en la frecuencia de visita de abejas a medida que se
9 incrementó la deposición de ceniza a lo largo de los campos de frambuesa. Para eso,
10 primero estimé la cantidad de ceniza depositada en cada uno de los 16 campos de
11 frambuesa usando funciones trigonométricas y un mapa en GIS, el cual mostraba las
12 isolíneas del grosor de ceniza (Gaitán et al. 2011). Luego analicé el efecto de la
13 cantidad de ceniza depositada sobre la frecuencia de visita de (i) todas las abejas como
14 grupo, y (ii) *Apis mellifera*, (iii) *Bombus terrestris*, y (iv) abejas nativas, separadamente,
15 y la presencia/ausencia de colmenas de abejas mieleras (dentro o en un radio de 100
16 metros del cultivo) en la frecuencia de visita de *A. mellifera*. Para el análisis de datos
17 usé modelos lineales generalizados de efectos mixtos (GLMM), debido a la naturaleza
18 discreta de las variables y a la estructura jerárquica del diseño de muestreo (i.e. muchos
19 censos de polinizadores pero solo un valor de deposición de ceniza por campo y errores
20 no-normales; Gelman & Hill 2007), incluyendo “campo” como efecto aleatorio y el
21 espesor de la capa de ceniza como efecto fijo. En estos análisis, el espesor de la capa de
22 ceniza (cm) (variable independiente) fue log-transformada debido a que tendía a
23 decrecer exponencialmente con la distancia al volcán. Más específicamente, esta
24 variable fue transformada como $\log_{10}(x+1)$ a que no había ceniza depositada en los
25 campos situados más al sur (Figura 1 en texto principal, Tabla C2-4). En los análisis
26 del número de visitas asumí una distribución del error binomial negativa, usando la
27 función de enlace \ln . Debido a que el número de flores de frambuesa observada en cada
28 censo no fue constante (ver Materiales y Métodos en el texto principal), incluí esta
29 variable en el modelo como un predictor más, de manera de incrementar el ajuste del
30 modelo. Luego del análisis, la variable respuesta fue dividida por el número de flores
31 para expresar frecuencia de visita como número de visitas $\cdot \text{flor}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$.

32 La frecuencia de visitas en flores de frambuesa considerándolas todas como
33 grupo fue negativamente afectada por la cantidad de ceniza depositada (estimado \pm SE

1 = -3.33 ± 0.45 , $Z = -7.32$, $P < 0.001$); decreciendo de 2.77 ± 0.06 a 0 cm hasta $0.012 \pm$
2 0.004 visitas \cdot flor⁻¹ \cdot 5 min⁻¹ a 13 cm de deposición de ceniza. A pesar de esta tendencia
3 general, las frecuencias de visitas de los dos principales visitantes florales, *A. mellifera*
4 y *B. terrestris*, estuvieron determinada por diferentes factores. La frecuencia de visita
5 de *A. mellifera* en los campos de frambuesa no estuvo influenciado significativamente
6 por la cantidad de ceniza depositada en el suelo (-1.43 ± 1.31 , $Z = -1.01$, $P = 0.31$; Fig.
7 C2-3), pero sí se vió fuertemente afectada con la presencia de colmenas (4.78 ± 1.03 , Z
8 $= 4.63$, $P < 0.001$). Campos con y sin colmenas recibieron (media \pm SE) 1.11 ± 0.21 y
9 0.02 ± 0.04 visitas \cdot flor⁻¹ \cdot 5 min⁻¹ de *A. mellifera*, respectivamente. Por el contrario, la
10 frecuencia de visitas de *B. terrestris* estuvo negativamente relacionada con la cantidad
11 de ceniza depositada (-3.66 ± 0.44 , $Z = -8.22$, $P < 0.001$; Fig. C2-3), decreciendo de 1.4
12 ± 0.23 visitas \cdot flor⁻¹ \cdot 5 min⁻¹ a 0 cm hasta 0.03 ± 0.02 visitas \cdot flor⁻¹ \cdot 5 min⁻¹ a 13 cm de
13 deposición de ceniza. Aunque representando un componente menor del ensamble total
14 de visitantes floreales, las abejas nativas también se vieron afectadas negativamente por
15 la cantidad de ceniza depositada (estimado \pm SE = -5.38 ± 1.72 , $Z = -3.12$, $P = 0.001$;
16 Fig. S1), decreciendo de 0.2 ± 0.06 a 0 ± 0 visitas \cdot flor⁻¹ \cdot 5 min⁻¹ a lo largo del mismo
17 gradiente de deposición de ceniza. Debido a que las frecuencias de visitas de *A.*
18 *mellifera* y *B. terrestris* estuvieron afectada por factores diferentes, las abundancias de
19 estos dos visitantes florales fueron independientes a lo largo de los campos de
20 frambuesa estudiados (ver Resultados en el texto principal).

21 Debido al que el número de drupas por fruto decreció con la frecuencia de
22 visitas de todas las abejas como grupo (ver Resultados en texto principal), la cual está
23 relacionada (negativamente) con la cantidad de ceniza (ver arriba), es importante
24 evaluar como la variación en el número de drupas puede ser de hecho explicada por las
25 visita de abejas y no por cualquier otro efecto confundido relacionado con la deposición
26 de ceniza. Más importante aún, las cenizas del volcán Puyehue tienen alto contenido de
27 potasio (Vallés et al. 2011), y, por lo tanto, su efecto como fertilizante podría
28 incrementar el set de drupas a través del incremento de drupas desarrolladas. Sin
29 embargo, Crego et al. (2012) reportaron que la deposición de cenizas no tiene efectos en
30 las propiedades del suelo a corto plazo. De hecho, el tiempo requerido por los
31 componentes de la ceniza para enriquecer los suelos está en el orden de los siglos
32 (Shoji, Nanzyo & Dahlgren 1993). En cualquier caso, el incremento en el peso del fruto
33 que puede ser atribuido vía fertilización en frambuesas ha sido reportado entre un 5-6 %

1 (Buskiene & Uselis 2008; Gercekcioglu 2008). Sin embargo, aquí hemos reportado
2 diferencias en el peso de los frutos superiores al 30% que pueden ser atribuidas
3 directamente a la no formación de drupas debido al daño en los pistilos (ver Resultados
4 en el texto principal), más que al peso individual de drupas o fallas en el desarrollo de
5 pistilos no dañados. Más aún, los campos que ocurren en la zona de suelos más
6 productivos son aquellos localizados más al sur del volcán, en los valles de El Bolsón,
7 Lago Puelo y El Hoyo (SAGPyA 2006; IICA 2012), donde no llegó ceniza del volcán
8 Puyehue, pero donde recordamos los frutos más livianos (i.e. con menos drupas por
9 fruto). Además, debido a que las frambuesas no exhiben ningún problema sanitario en
10 particular causado por herbívoros, hongos, u otros patógenos en nuestro sistema de
11 estudio (SAGPyA 2006), no hay lugar a pensar que la ceniza haya actuado como agente
12 de control de plagas. Otro factor que podría influenciar de manera directa la
13 variabilidad observada en el número de drupas por fruto es el número de pistilos por flor
14 (i.e. óvulos). Por este motivo, usamos GLMM para evaluar si el número de pistilos por
15 flor estaba relacionado con la cantidad de ceniza depositada. Como en los otros
16 modelos de regresión, asumimos una distribución del error binomial negativa e
17 incorporamos “campo” como efecto aleatorio. Los resultados no mostraron evidencia
18 de que el número de pistilos por flor variara significativamente con la cantidad de
19 ceniza depositada (estimado \pm SE = 0.07 ± 0.06 , $Z = 1.3$, $P = 0.19$). Finalmente, aunque
20 condiciones climáticas extremas (e.g. heladas o eventos climáticos extremos) pueden
21 producir daño floral, no han ocurrieron heladas y/o tormentas severas, y no ocurren
22 normalmente, durante Enero y Febrero, correspondientes a los meses más cálidos y
23 secos en el NO Patagónico, cuando este estudio fue realizado. Las temperaturas
24 mínimas promedio en los sitios más altos son de 6.5°C durante Enero y Febrero
25 (Hijamans et al. 2005). Más aún, los campos localizados a las mayores alturas fueron
26 aquellos con las menores incidencias de daño a pistilos. Por lo tanto, las condiciones
27 climáticas extremas no pueden explicar el patrón espacial en el daño a los pistilos que
28 aquí reportamos. Basados en estos argumentos, puedo concluir que el daño a los
29 pistilos es el efecto más directo que explica la variación en el set de drupas entre los
30 campos de frambuesa de estudio.

31

32

1 **Apéndice C2-2.** Análisis de auto-correlación espacial.

2 Los campos localizados cercanos en el espacio podrían ser más similares entre sí
3 en muchos aspectos que aquellos lejanos, más allá de cualquier efecto asociado a la
4 disposición de ceniza en las variables respuesta. Por lo tanto, si la deposición de ceniza
5 explica completamente la estructura espacial de los datos, no deberíamos encontrar
6 diferencias de auto-correlación espacial en los residuales de nuestros modelos de
7 regresión (Diniz-Filho, Bini & Hawkins 2003). Para evaluar esta posibilidad, promedié
8 los residuales de cada una de nuestras observaciones por campo estimados de los
9 modelos jerárquicos y los correlacionamos con una matriz de distancia, la matriz de las
10 distancias geográficas y la matriz de las diferencias absolutas de las medias residuales
11 entre todos los pares de campos muestreados (i.e. $[x]/2 = 120$ pares). Luego estimé el
12 coeficiente de correlación de Mantel y estimé su significancia basándonos en 10000
13 permutaciones aleatorias de un de las matrices (Legendre y Fortin 1989).

14 El test de Mantel no mostró evidencia de auto-correlación espacial en los
15 residuales del modelo de frecuencia de visita de todas las abejas como grupo ($r = 0.11$,
16 $P = 0.18$), *A. mellifera* ($r = -0.09$, $P = 0.77$), *B. terrestris* ($r = -0.009$, $P = 0.48$), o abejas
17 nativas ($r = 0.03$, $P = 0.34$). Según esto, la estructura espacial de los datos no puede
18 explicar la variación en la frecuencia de visita más allá de lo explicado por la ceniza.

19

20

21

22

23

24

25

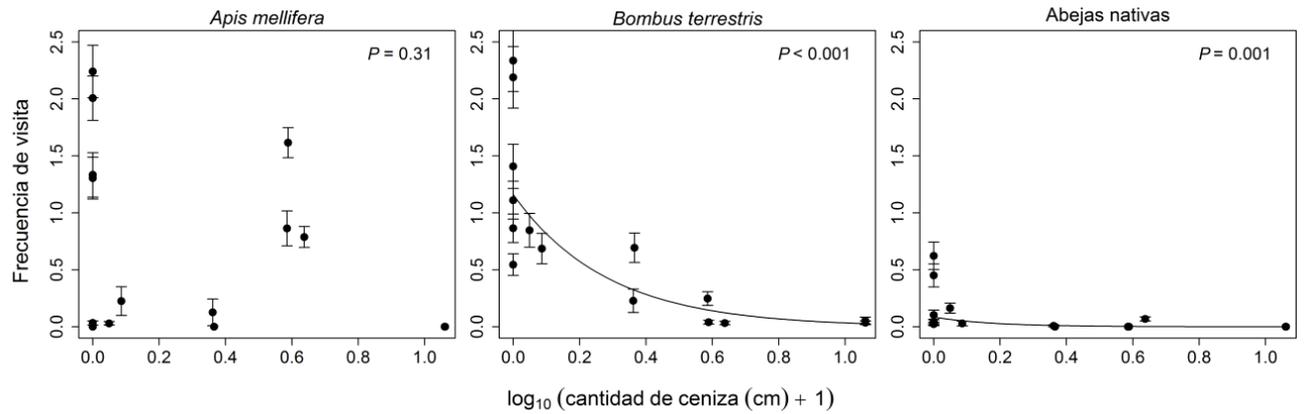
26

27

28

1 **Figura C2-3.** Efectos de la deposición de ceniza sobre la frecuencia de visita de abejas.

2 Relaciones entre la frecuencia de visita (estimada como número de visitas flor-1
3 5 min-1) de *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* y abejas nativas con la cantidad de
4 ceniza depositada en cada campo. Los círculos representan valores medios por campo
5 (± 1 SE) mientras que la línea sólida representa la curva estimada por el modelo de
6 regresión, asumiendo una distribución del error binomial negativa.



7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

- 1 **Tabla C2-4.** Características de los campos de frambuesa estudiados. Coordenadas geográficas y características de los 16 campos de frambuesa
 2 estudiados. Los sitios se encuentran ordenados de Sur a Norte.

Sitio	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Ceniza depositada (cm) *	Colmenas	Tratamiento de suplementación de polen	Frecuencia de visitas de <i>A. mellifera</i> (no. visitas · flor ⁻¹ · 5 min ⁻¹)	Frecuencia de visita de <i>B. terrestris</i> (no. visitas · flor ⁻¹ · 5 min ⁻¹)	Frecuencia de visita de abejas nativas (no. visitas · flor ⁻¹ · 5 min ⁻¹)
1	-42.0469	-71.5103	249	0	Si	No	2.24	0.54	0.04
2	-42.0103	-71.528	459	0	Si	Si	1.33	1.4	0.1
3	-41.9997	-71.5524	305	0	Si	No	2	1.11	0.02
4	-41.9455	-71.5211	440	0	Si	Si	1.3	0.86	0.02
5	-41.6059	-71.5393	686	0	No	No	0	2.33	0.62
6	-41.6025	-71.6068	561	0	Si	No	0.03	2.18	0.45
7	-41.2438	-71.4627	1489	0.12	No	No	0.03	0.84	0.16
8	-41.107	-71.203	809	3.3	Si	Si	0.78	0.03	0.06
9	-41.1018	-71.4959	904	1.3	No	No	0.12	0.22	0.008
10	-41.0955	-71.5113	1077	1.3	No	Si	0	0.69	0
11	-40.8009	-71.5839	795	10.5	No	Si	0	0.03	0
12	-40.795	-71.5859	790	10.5	No	No	0	0.05	0
13	-40.7736	-71.6599	823	13.6	No	Si	0	0.01	0
14	-40.1256	-71.2537	994	2.8	Si	No	1.6	0.04	0
15	-40.1248	-71.2967	995	2.8	Si	No	0.86	0.24	0
16	-39.773	-71.0649	886	0.20	Si	No	0.22	0.68	0.02

- 4 *Fuente: Gaitan, J.J., Ayesa, J.A., Umaña, F., Raffo, F. & Bran, D.B. (2011) Cartografía del área afectada por cenizas volcánicas en las
 5 provincias de Río Negro y Neuquén. pp. 8. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuria (INTA), Estación experimental S.C. de Bariloche.

6

7

1 **Tabla C2-5.** Modelos de regresión. Variables, unidades, distribuciones del error y resultados de los modelos de regresión empleados en los datos.

2

Variable independiente	Variable dependiente	Unidades	Distribución del error	Función de enlace	No. de campos	No. de frutos o flores	Efectos fijos		
							β	SE	Z-value
Frecuencia de visita (Apoidea)	(1) Deposición de polen	No. granos de polen stigma ⁻¹	Binomial negativa	<i>ln</i>	16	399	0.17	0.06	2.55 *
Frecuencia de visita (<i>A.m + B.t</i>)	(1) Deposición de polen	No. granos de polen stigma ⁻¹	Binomial negativa	<i>ln</i>	16	399	<i>A.m</i> = 0.26 <i>B.t</i> = 0.12	0.09 0.10	2.85** 1.21
Frecuencia de visita (Apoidea)	(2) Daño estilos	Estigma presente o ausente (1 o 0)	Beta binomial	<i>logit</i>	16	477	1.48	0.22	6.55***
Frecuencia de visita (<i>A.m + B.t</i>)	(2) Daño estilos	Estigma presente o ausente (1 o 0)	Beta binomial	<i>logit</i>	16	477	<i>A.m</i> = 1.2 <i>B.t</i> = 1.98	0.31 0.34	3.84*** 5.74***
Frecuencia de visita (Apoidea)	(3) Set de drupas	No. de drupas fruto ⁻¹	Binomial negativa	<i>ln</i>	12	429	-0.12	0.04	-2.62**
Frecuencia de visita (<i>A.m + B.t</i>)	(3) Set de drupas	No. de drupas fruto ⁻¹	Binomial negativa	<i>ln</i>	12	429	<i>A.m</i> = -0.12 <i>B.t</i> = -0.15	0.06 0.07	-1.95 -2.01*
Deposición de polen	(3) Set de drupas	No. de drupas fruto ⁻¹	Binomial negativa	<i>ln</i>	12	429	0.007	0.005	-1.5
Daño estilos	(3) Set de drupas	No. de drupas fruto ⁻¹	Binomial negativa	<i>ln</i>	12	429	-0.64	0.18	-3.44***

1

2

Capítulo 3.

3

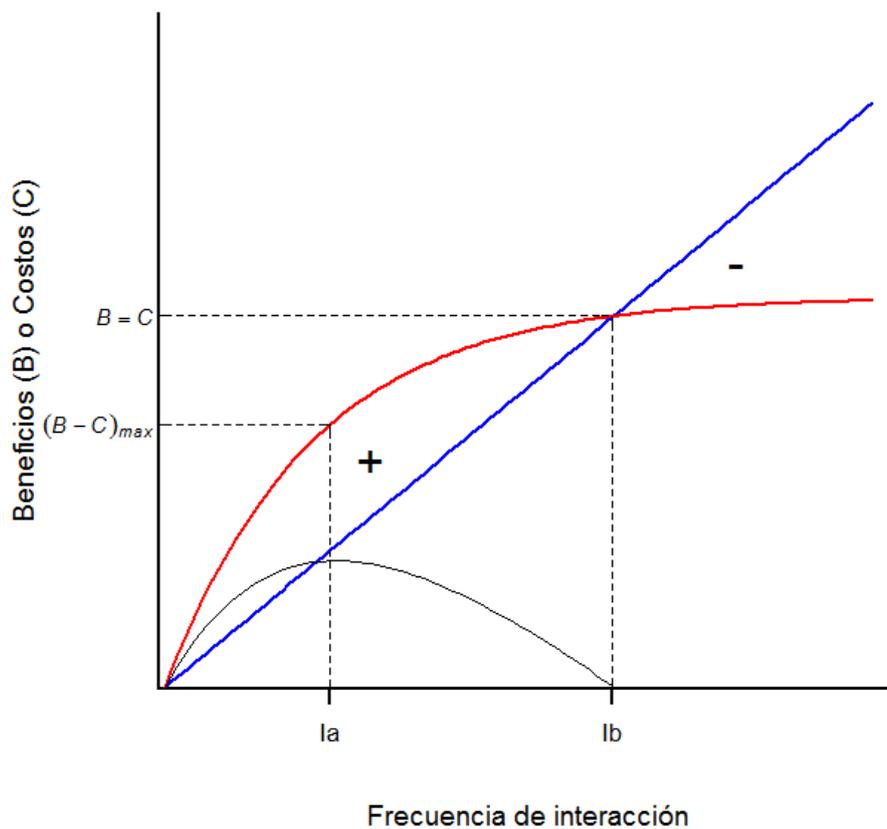
4

Modelo mecanicista de los costos y beneficios de la polinización para cultivos: frecuencia de visita e identidad de polinizadores predicen la calidad de frutos en frambuesa.

5

6

7



8

9 *El contenido de este capítulo se encuentra en revisión como:*

10 Sáez A., Morales J.M., Morales C.L., Harder L. & Aizen M.A. A mechanistic benefit-
11 cost pollination model for crops: visit frequency and pollinator identity predict fruit
12 quality in raspberry en *Ecological Applications*

1 **Resumen**

2 Los cultivos dependientes de polinizadores muestran a escala mundial un
3 incremento desproporcionado en su área cultivada asociada con demandas de mercado
4 crecientes. Aquí desarrollé un modelo estocástico mecanicista para identificar cómo
5 sería un servicio de polinización óptimo, en términos de frecuencia de visitas de
6 polinizadores e identidades, para maximizar la producción en frambuesa. Las funciones
7 y parámetros usados en el modelo derivaron de una serie de experimentos de campo, los
8 cuales describen las diferentes variables y eventos asociados a los procesos de
9 polinización (i.e. grado de auto-polinización, deposición de polen con la visita de
10 polinizadores y daño floral) y post-polinización (i.e. carga mínima de polen que gatilla
11 la germinación del polen, tiempo requerido desde la germinación del polen hasta la
12 fertilización del óvulo) que determinan la calidad del fruto (i.e. número de drupas por
13 fruto). El modelo predijo una relación de tipo cóncava en la calidad de frutos de
14 frambuesa a medida que se incrementa la frecuencia de visita de los polinizadores a las
15 flores. Se estimó que entre 6 y 22 visitas de *Apis mellifera* o entre 4 y 14 visitas de
16 *Bombus terrestris*, los dos principales polinizadores en nuestra área de estudio, a lo
17 largo de los 2.5 días de vida de la flor maximizan la calidad de frutos. Flores de campos
18 que reciben más de aprox. 620 visitas de la abeja mielera o 428 del abejorro, frecuencias
19 observadas a campo en estudios previos, es esperado que produzcan frutos de menor
20 calidad que sin abejas, debido a que los costos asociados con el daño floral superan los
21 beneficios de la polinización animal. Aunque este modelo fue construido usando a la
22 frambuesa como cultivo focal podría ser fácilmente adaptado a cualquier otro cultivo
23 dependiente de polinizadores, y en consecuencia ser utilizado como una herramienta
24 para guiar prácticas de manejo eficientes en los agoecosistemas del mundo.

25

26

27

28

29

30

1 **Introducción**

2 Los cultivos dependientes de polinizadores muestran un desproporcionado
3 incremento en su área cultivada en todo el mundo, asociado a las aceleradas demandas
4 de un mercado creciente (Aizen et al. 2008). Desafortunadamente, este continuo
5 incremento de las tierras cultivadas amenaza la biodiversidad en general (Sala et al.
6 2000) y los polinizadores en particular (Robinson y Sutherland 2002; Benton et al.
7 2003). Por esta razón, el manejo activo de polinizadores es una práctica común en la
8 mayoría de los agroecosistemas para suplementar el servicio de polinización provisto
9 por visitantes florales silvestres (Winfree et al. 2009; Garibaldi et al. 2014). Las abejas
10 mieleras (*Apis mellifera*) y, más recientemente, algunas especies de abejorros (*Bombus*
11 spp.) son las especies más comúnmente usadas específicamente para servicios de
12 polinización (Velthuis yVanDoorn 2006). Las prácticas de manejo actuales asumen
13 incrementos monotónicos en los beneficios netos (e.g. producción) con la abundancia de
14 polinizadores (e.g. número de colmenas) (Dewenter 2003; Benjamin et al. 2014; King
15 et al. 2013). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la producción de frutos
16 y/o semillas pueden declinar a altas tasas de visita, un resultado que puede ser explicado
17 por un incremento más acelerado de algunos de los costos de la interacción planta-
18 polinizador (e.g. daño floral) que de sus beneficios (e.g. deposición de polen) a partir de
19 cierto umbral de visitas (Morris et al. 2010; Aizen et al. 2014; Saez et al. 2014). Por lo
20 tanto, la optimización de los componentes críticos de la polinización, como calidad y
21 cantidad de frutos, en cultivos dependientes de polinizadores requiere un detallado
22 conocimiento biológico no sólo de sus requerimientos de polinización y sistemas
23 reproductivos, sino también de cómo los beneficios y costos dependen de la densidad e
24 identidad de los polinizadores.

25 En cultivos dependientes de polinizadores bajo limitación polínica (i.e. cuyas
26 flores reciben muy pocos granos de polen como para fecundar todos sus óvulos), se
27 espera observar un incremento en la producción del cultivo debido a una mayor
28 deposición de polen al incrementarse la densidad de polinizadores. De hecho, algunos
29 estudios han mostrado que al aumentar el número de abejas manejadas (e.g. colmenas
30 de *A. mellifera*) cercanas o dentro de los campos cultivados llevó a un incremento en la
31 productividad del cultivo (Benjamin et al. 2014). Sin embargo, incrementos
32 desproporcionados en la densidad de polinizadores puede saturar los beneficios
33 derivados de la deposición de polen, mientras se incrementan los costos de la

1 interacción (e.g. daño floral). Por lo tanto, reducciones en los beneficios netos a altas
2 densidades se podrían traducir en la producción de frutos o semillas de menor número o
3 calidad (Aizen et al. 2014). Este escenario ha sido descrito en especies cultivadas en
4 campos provistos con un alto número de colmenas de abejas mieleras y en regiones
5 invadidas por el abejorro exótico *Bombus terrestris* (Bandano et al. 2011; Saez et al.
6 2014). Más aún, beneficios y costos pueden diferir entre polinizadores dependiendo, por
7 ejemplo, del tamaño corporal y comportamiento. Esto abre la posibilidad que mayores
8 beneficios (e.g. producción) puedan ser obtenidos a través de un manejo orientado a
9 alcanzar regímenes de polinización óptimos en términos de densidad e identidad de
10 polinizadores. Específicamente, el diseño de este tipo de manejo de polinizadores
11 debería ser capaz de indicar rangos de abundancias de abejas e identidades que
12 maximicen los componentes claves de la producción de cultivos. Debido a que estos
13 componentes claves relacionados a la polinización incluyen frutos y semillas, estos
14 implican un entendimiento detallado de los procesos de polinización y post
15 polinización.

16 Aquí desarrollé un modelo mecanicista estocástico para identificar qué
17 constituye un servicio de polinización óptimo para maximizar la calidad de frutos en
18 frambuesa, en términos de frecuencia de visita e identidad de polinizadores. Este
19 modelo está basado en una serie de experimentos de campo orientados a estimar
20 parámetros claves y a identificar funciones que describen los diferentes procesos de
21 polinización y post polinización que determinan el número de drupas por fruto. Esto
22 requirió la estimación de: (1) el grado de auto-fertilización autónoma, (2) la función que
23 describe cómo se incrementa la deposición de polen con el número e identidad de los
24 visitantes florales, (3) el número mínimo de granos de polen en el estigma necesarios
25 para gatillar la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, (4) el tiempo
26 requerido desde la germinación del polen hasta la fertilización del óvulo, y (5) la
27 función que describe cómo el daño a los estilos se incrementa con el número e identidad
28 de los visitantes florales. Un factor crítico incorporado en nuestro modelo es que la
29 fertilización no va a ocurrir, a pesar de una polinización adecuada, si el daño a los
30 estilos interrumpe el crecimiento del tubo polínico. En frambuesa, este es el costo de
31 interacción más importante que se incrementa con la densidad de abejas (Saez et al.
32 2014, Capítulo 2 de esta Tesis). Aquí usé estos datos del número de drupas por fruto en
33 función de la variación espacial en la frecuencia de visita de abejas mieleras y *B.*

1 *terrestris* para poner a prueba cuán bien ajustaba nuestro modelo. Aunque este modelo
2 ha sido desarrollado específicamente para predecir beneficios y costos relacionados con
3 la polinización en frambuesa, este incluye la mayoría de los elementos biológicos claves
4 necesarios para modelar la dinámica de polinización de cualquier cultivo dependiente de
5 polinizadores o plantas silvestres.

6 **Materiales y Métodos**

7 *Sitio de muestreo y cultivo de estudio*

8 Los experimentos de campo para estimar las funciones y parámetros del modelo
9 (ver abajo y Apéndices) fueron realizados durante el verano austral del 2013 (Enero-
10 Marzo) en una plantación de frambuesa (*Rubus idaeus*, variedad Autumn bliss) de la
11 chacra “Arroyo Claro” (41° 56.700 S; 71° 31.200 W), localizada cerca de El Bolsón,
12 Río Negro, Argentina. Las flores de frambuesa son hermafroditas, completamente auto-
13 compatibles, pero su estructura (i.e. 80-100 pistilos ubicados en un núcleo central)
14 impide la auto-polinización completa. Específicamente, el polen del anillo de anteras
15 periférico no puede contactar los pistilos ubicados en posición más central de la flor en
16 ausencia de vectores de polen (Cane 2005). Aunque la mayoría de las flores de
17 frambuesa pueden formar fruto en ausencia de visitas de abejas, las flores no visitadas
18 producen una mayor cantidad de frutos malformados, con menos drupas que aquellas
19 flores que fueron visitadas (Cane 2005; Morales 2009). En consecuencia, la mayoría o
20 todos los óvulos de una flor deben ser fertilizados para asegurar la producción de frutos
21 de alta calidad comercial (Cane 2005). Es por esta razón que colmenas de abejas o
22 abejorros son comúnmente utilizadas en las plantaciones de frambuesas para asegurar
23 niveles de polinización adecuados (Velthuis y VanDoorn 2006). En el NO Patagónico,
24 las flores de frambuesa son mayormente visitadas por la abeja manejada *Apis mellifera*
25 y por el abejorro invasor *Bombus terrestris* (ver Morales 2009). Sin embargo, las abejas
26 pueden dañar los estilos de la flor mientras visitan las flores, potencialmente
27 interrumpiendo la polinización al impedir el crecimiento del tubo polínico a lo largo del
28 estilo (Saez et al. 2014, Capítulo 2 de esta Tesis). En un estudio previo se ha observado
29 que este daño a los estilos se incrementa con la frecuencia de visita a las flores, siendo
30 las visitas de *B. terrestris* más dañinas que las de *A. mellifera*.

31 *Modelo de polinización*

1 Aquí desarrollé un modelo de simulación estocástico para representar los
2 procesos de polinización y post-polinización relacionando mecánicamente la
3 polinización con el desarrollo del fruto en frambuesas. Simulé un gradiente de
4 frecuencias de visitas (i.e. número de visitas \cdot flor⁻¹ \cdot hora⁻¹) y sus efectos en el proceso
5 de polinización (i.e. deposición de polen a través de las visitas), y en los procesos post-
6 polínicos (i.e. germinación del polen y crecimiento de tubos polínicos) y daño floral (i.e.
7 daño al estilo a través de las visitas). En el modelo, el número de pistilos por flor, cada
8 uno con un único óvulo, fue simulado muestreando de una distribución de Poisson con
9 λ igual a 95 (i.e. número promedio de pistilos por flor de una muestra de ~500
10 flores). La frecuencia de visita a las flores se incrementó desde 0 a 35 por hora, a
11 intervalos de 0.01 visitas \cdot flor⁻¹ \cdot hora⁻¹ (i.e. 0 a 700 visitas durante la vida de una flor,
12 ver abajo). Este rango de visitas imita la variabilidad natural observada a lo largo de 16
13 plantaciones de frambuesa como reportamos previamente (ver Capítulo 2). El número
14 de visitas por hora fue incorporado en el modelo muestreando de una distribución de
15 Poisson para cada valor de frecuencia de visita, realizando 1000 réplicas para cada
16 valor. El modelo desarrollado registra y actualiza el estado de cada pistilo de cada flor
17 simulada cada hora (i.e. (1) número de granos de polen acumulados en el estigma; (2)
18 presencia de al menos un grano de polen germinado y tubo polínico creciendo a través
19 del estilo o no; (3) estilo dañado o no; (4) crecimiento de tubo polínico interrumpido o
20 no si el estilo fue dañado; (5) fertilización o no del óvulo). Al final, el estado de cada
21 óvulo (fertilizado o no), fue el resultado de los procesos de polinización y post-
22 polinización luego de 20 horas de actividad de polinizadores. Este tiempo de actividad
23 resulta de asumir 8 horas de visitas por día multiplicado por un estimado de 2.5 días de
24 vida de una flor (A. Sáez observación personal). La salida del modelo fue la proporción
25 de pistilos que desarrollaron una drupa. Este modelo fue creado para explicar toda la
26 variación en la proporción de drupas derivadas de los procesos de polinización y post-
27 polinización, asumiendo que los recursos no son limitantes (i.e. agua, luz o nutrientes),
28 los cuales de hecho pueden afectar el éxito de la fructificación.

29 Cada uno de los procesos de polinización del modelo fue simulado por funciones
30 determinísticas estimadas mediante experimentos de campo y datos reportados en la
31 literatura, incorporando la estocasticidad a través de las distribuciones de probabilidad
32 definidas para cada función. Ajusté funciones que explicaban los patrones observados
33 en los datos usando estimaciones de máxima verosimilitud con la función *mle2* del

1 paquete de R *bbmle* (Bolker 2012). Abajo presento un resumen de los procesos de
2 polinización y post-polinización involucrados en el modelo, mientras que la descripción
3 detallada de las funciones y parámetros se encuentran en los Apéndices C3-1 a C3-5.

4 Primero determiné la dependencia de polinizadores en frambuesa a través de la
5 estimación del número de drupas desarrolladas por fruto en ausencia de visitas de
6 polinizadores aislando 52 flores con tul antes de su antesis (ver Apéndice C3-1). En el
7 modelo de simulación los niveles de auto-polinización fueron muestreados de una
8 distribución de Poisson con λ igual a la proporción de drupas desarrolladas en
9 ausencia de visitas de polinizadores (i.e. 0.65). El proceso de deposición de polen por
10 polinizadores (i.e. número de granos de polen depositados en la superficie estigmática
11 por visita) fue modelado ajustando una función de crecimiento exponencial asintótica
12 con una distribución de Poisson. La estimación de parámetros para *Apis mellifera* fue
13 obtenida de experimentos de campo, los cuales consistieron en exponer flores recién
14 abiertas a las visitas de las abejas durante tiempos variables (ver Apéndice C3-2).
15 Basándome en información previa de un estudio que comparó la deposición de polen
16 por visita de abejas mieleras y abejorros en estigmas vírgenes de frambuesa (Wilmer et
17 al. 1994), la tasa de deposición de polen para *B. terrestris* fue estimada asumiendo que
18 durante la primer visita este abejorro deposita el doble de polen que *A. mellifera* (ver
19 Wilmer et al. 1994 y Apéndice C3-2).

20 Una vez que el polen se deposita en el estigma los granos germinan y los tubos
21 polínicos comienzan a crecer hacia el ovario. Sin embargo, usualmente existe un
22 número crítico de granos de polen >1 que necesitan ser depositados en el estigma para
23 gatillar la germinación y el subsecuente crecimiento del tubo polínico (Schemske y
24 Fenster 1983; Cruzan 1986). Aquí estimé este valor umbral para la frambuesa
25 relacionando la germinación del polen con la cantidad total de granos de polen en el
26 estigma. Modelé la probabilidad de observar al menos un grano de polen germinado en
27 función del polen total depositado usando una función de crecimiento exponencial
28 asintótica modificada con una distribución Binomial (ver Apéndice C3-3).

29 Una vez que el polen germina los tubos polínicos comienzan a crecer hacia la
30 base del estilo. Basándome en experimentos de campo donde cortamos los estilos de la
31 flor a diferentes tiempos luego de realizar polinización manual, estimé que ~27 horas
32 son necesarias para completar la fertilización (Apéndice 4). Sin embargo, debido a que

1 los polinizadores usualmente rompen el estilo cerca del ápice (i.e. ~10% del largo del
2 estilo), estimé que existe una ventana de 2 horas luego de la germinación durante la cual
3 el daño al estilo puede interrumpir el crecimiento del tubo polínico y, por lo tanto, la
4 fertilización no ocurrirá (ver Apéndice C3-4).

5 La probabilidad de daño a los estilos fue modelada en función del número de
6 visitas usando una función de crecimiento exponencial asintótico modificada siguiendo
7 una distribución Binomial. Cuantifiqué este daño a los estilos para *A. mellifera* de las
8 mismas flores que usamos para cuantificar cambios en la deposición de polen en el
9 tiempo. Basándome en información previa (ver Saez et al. 2014, o Capítulo 2 de esta
10 Tesis), la tasa de daño al estilo para *B. terrestris* fue modelada asumiendo que, por
11 visita este abejorro es intrínsecamente 1.65 veces más dañino que *A. mellifera* (ver
12 Apéndice C3-5).

13 *Escenarios de simulación*

14 Debido a que cada uno de los visitantes florales de frambuesa (*A. mellifera* y *B.*
15 *terrestris*) tienen sus propios parámetros de deposición de polen y daño al estilo (ver
16 Apéndices C3-2 y C3-5) primero simulé dos escenarios: (i) sólo visitas de *A. mellifera*,
17 y (ii) sólo visitas de *B. terrestris*. Luego simulé (iii) un escenario mixto de visitas
18 donde para cada valor de frecuencia de visita combinado de *A. mellifera* y *B. terrestris*
19 estimamos el resultado esperado. El número de visitas por hora de cada polinizador fue
20 incorporado al modelo muestreando de una distribución de Poisson, corriendo 1000
21 réplicas para cada combinación de frecuencia de visitas.

22 *Validación del modelo y análisis de sensibilidad*

23 Para evaluar la eficacia del modelo simulé 12 escenarios específicos, cada uno
24 con una frecuencia de visita particular y proporciones de *A. mellifera* / *B. terrestris*
25 observada durante la temporada 2012 (para más detalles ver Saez et al. 2014 o Capítulo
26 2 de esta Tesis), y estimé la bondad de ajuste del modelo realizando una regresión entre
27 los valores observados del set de drupas con aquellos predichos por nuestro modelo de
28 simulación (Piñeiro et al. 2008). El r^2 de la regresión lineal muestra cuánto de la
29 variación lineal en los valores observados es explicado por la variación en los valores
30 predichos, mientras que la pendiente e intercepto describen la consistencia y sesgo,
31 respectivamente (Piñeiro et al. 2008). Para cada uno de los 12 campos, simulé la misma

1 cantidad de frutos que habíamos cosechado en 2012 para tener una comparación
2 balanceada.

3 Finalmente, estimé la importancia relativa de los diferentes parámetros de
4 entrada en la variable de salida (i.e. proporción de drupas) del modelo de simulación
5 conduciendo análisis de sensibilidad de Sobol (Saltelli 2002) (ver Apéndice C3-6). El
6 método de Sobol provee dos clases de índices. Los índices de primer orden representan
7 la contribución directa de cada factor, a través de los parámetros que los representan, a
8 la varianza total de la salida del modelo (i.e. porcentaje de la varianza total que es
9 explicada por cada factor), mientras que los índices totales representan la varianza
10 explicada directamente por cada factor más los efectos indirectos través de interacciones
11 con los otros factores. Los análisis de sensibilidad fueron desarrollados para los
12 parámetros que describen las funciones de auto-polinización (ver Apéndice C3-1),
13 deposición de polen (ver Apéndice C3-2), germinación del polen (ver Apéndice C3-3),
14 daño a los estilos (ver Apéndice C3-5) y la ventana temporal en la cual los tubos
15 polínicos pueden ser interrumpidos debido al daño en los estilos (ver Apéndice C3-4).

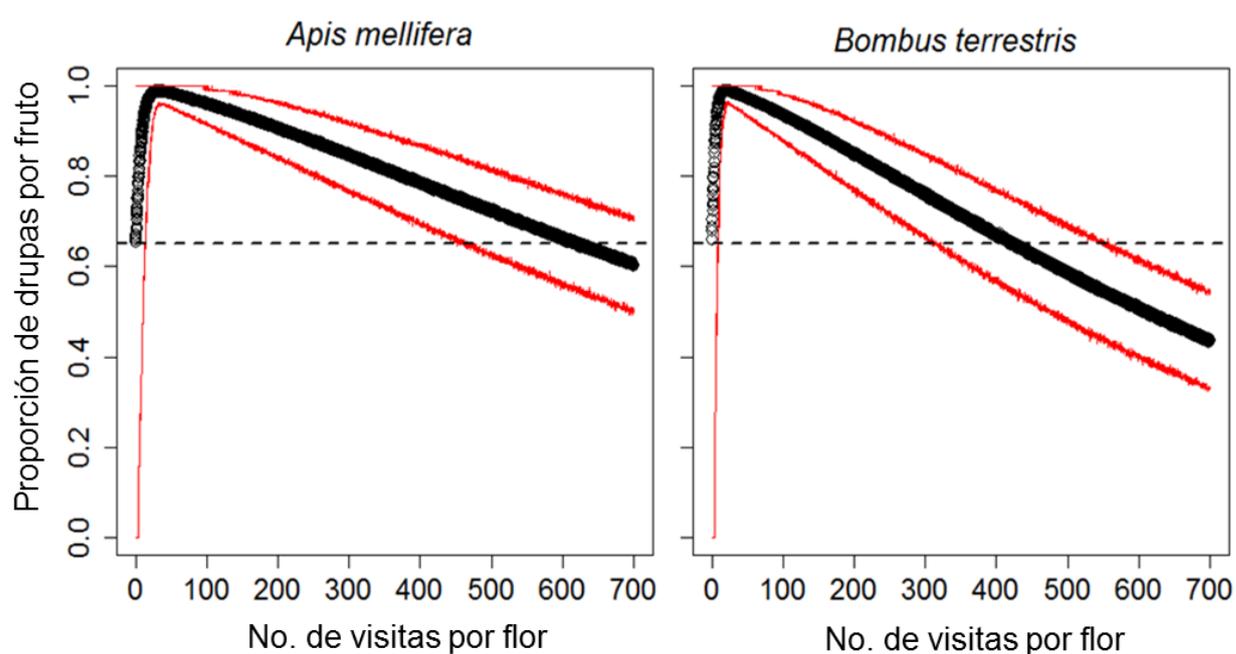
16 **Resultados**

17 La densidad e identidad de los polinizadores afectó la proporción de drupas
18 desarrolladas en los frutos de frambuesa. Para las dos especies de polinizadores (*A.*
19 *mellifera* y *B. terrestris*) el cuajado de drupas mostró un rápido incremento sobre el
20 nivel base de ~65% determinado por auto-polinización con las primeras visitas de los
21 polinizadores seguido de un decrecimiento gradual luego del número de visitas óptimo
22 (Fig. 1). En particular, el modelo de simulación para *A. mellifera* como único visitante
23 floral predijo un porcentaje de drupas máximo cercano al 99% entre las 6 y 22 visitas
24 totales por flor (Fig.1, panel izquierdo). El modelo también predijo que >620 por flor
25 da como resultado frutos con menos drupas que las generadas por auto-polinización
26 (Fig. 1, panel izquierdo). La simulación con *B. terrestris* como único visitante floral
27 predijo la máxima proporción de drupas por fruto de cerca de 99% con entre 4 y 14
28 visitas por flor (Fig. 1, panel derecho). El modelo también predijo que >428 visitas por
29 flor de este abejorro dan como resultado frutos con menos drupas que las formadas por
30 simple auto-polinización (Fig. 1, panel derecho). Cuando ambos polinizadores se
31 encontraban visitando las flores de frambuesas conjuntamente, el máximo beneficio
32 neto en el cuajado de drupas aparece bajo la combinación de visitas delineada entre las

1 isolíneas de 0.98 del gráfico (e.g. 8 visitas de cada polinizador maximiza el cuajado de
2 drupas) (Fig. 2).

3

4 **Figura 1.** Relación de la proporción de pistilos que desarrollaron drupa (i.e. cuajado de
5 drupas) con el número de visitas de *Apis mellifera* (panel izquierdo) y *Bombus terrestris*
6 (panel derecho). Los círculos negros indican la predicción promedio del modelo de
7 simulación, mientras que las líneas rojas los cuantiles 0.025 y 0.975. La línea negra
8 punteada indica el set de drupas esperado por auto-polinización. Efectos positivos netos
9 de la interacción planta-animal ocurren cuando la curva se encuentra por encima de la
10 línea punteada.



11

12

13

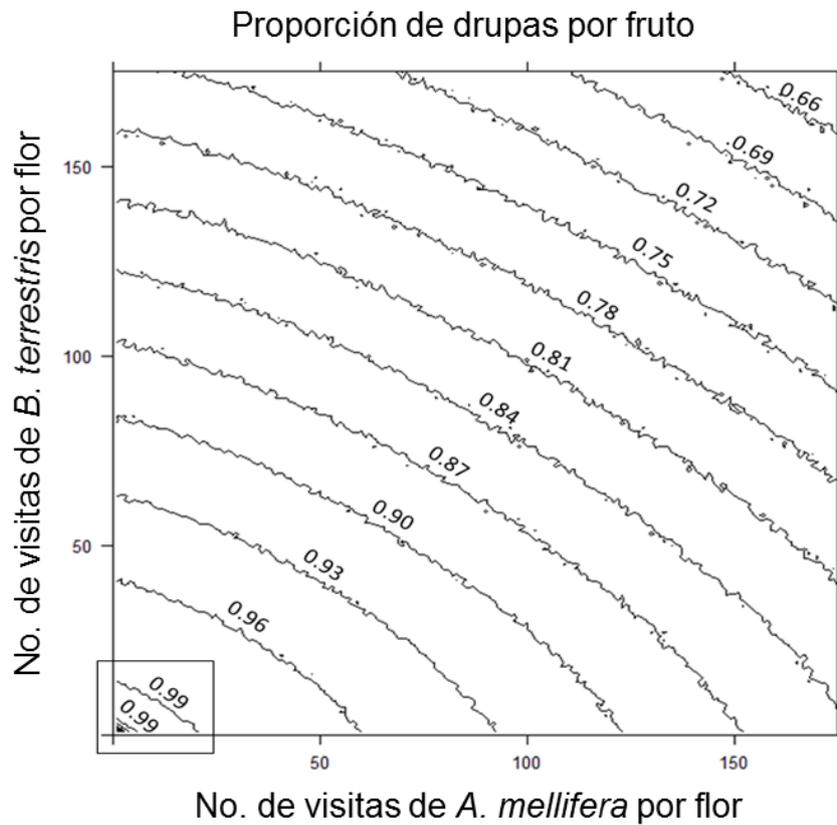
14

15

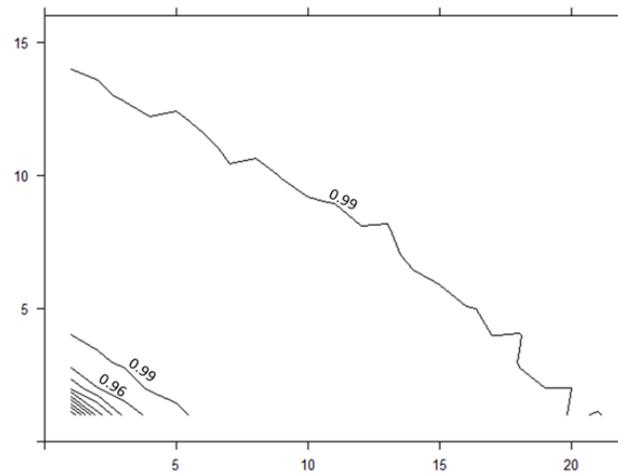
16

17

1 **Figura 2.** Gráfico de contorno de la proporción de pistilos que desarrollaron drupa (i.e.
 2 cuajado de drupas) para distintas combinaciones de visitas de *Apis mellifera* y *Bombus*
 3 *terrestris* (desde 0 a 170 visitas para cada polinizador). El recuadro ubicado en la
 4 esquina izquierda abajo representa la región expandida abajo.



5

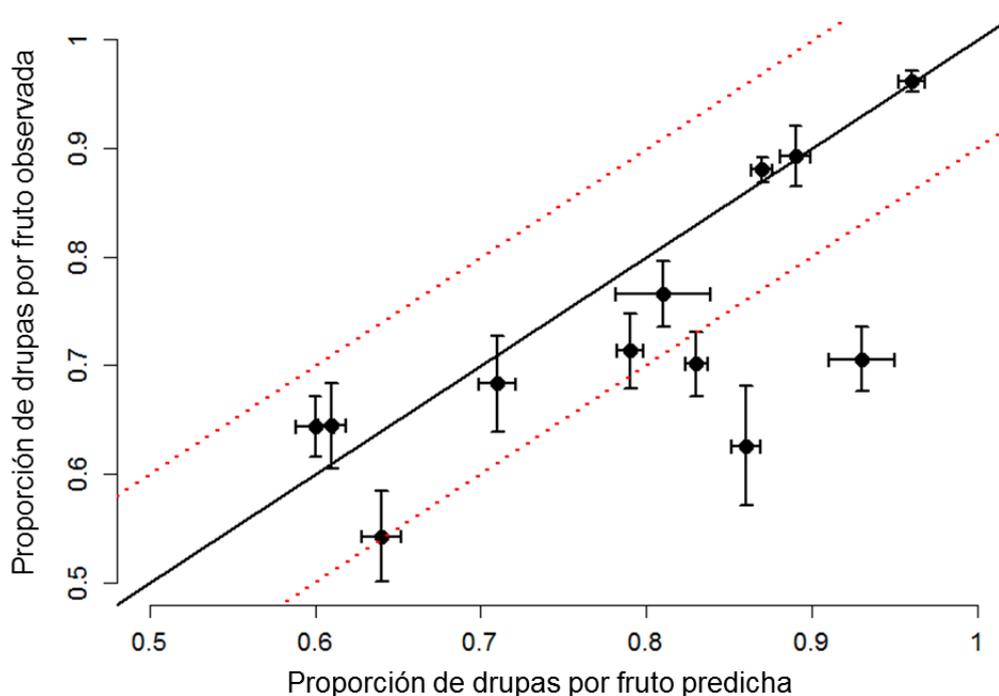


6

7 Estimaciones de la bondad de ajuste del modelo mostraron una relación positiva
 8 entre la proporción de drupas por fruto observadas con aquellas predichas por el modelo
 9 ($\beta_0 \pm 2SE = 0.23 \pm 0.30$, $\beta_1 \pm SE = 0.64 \pm 0.40$, $n = 12$, $r^2 = 0.50$, $P = 0.009$) (Fig. 3).

1 Interesantemente, el intervalo de confianza del 95% para los parámetros estimados
2 mostró que cero es un valor probable para la ordenada al origen (95% CI: -0.11 - 0.58),
3 mientras que uno resultó un valor probable para la pendiente (95% CI: 0.19 - 1.1).
4 Aproximadamente, el 70% de los valores medios predichos por el modelo presentaron
5 niveles de imprecisión menores al $\pm 10\%$ de la proporción observada de drupas por
6 fruto, mientras que el 30% restante mostró un error de estimación entre ± 10 y 20% del
7 cuajado de drupas observado (Fig. 3).

8 **Figura 3.** Relación entre la proporción de pistilos que desarrolla drupa (i.e. set de
9 drupas) observada con la predicha por el modelo de simulación para las 12 plantaciones
10 de frambuesa muestreadas. Los puntos indican valores medios ± 2 SE. La línea negra
11 representa una recta con intercepto = 0 y pendiente = 1.



12

13

14 El análisis de sensibilidad detectó el parámetro de escala (tasa) de la función de
15 germinación de polen como el parámetro de mayor efecto de primer orden en el set de
16 drupas, seguido del parámetro de tasa de la función de deposición de polen y daño a los
17 estilos (ver Apéndice C3-6). Los efectos totales del análisis de sensibilidad (i.e.
18 directos e indirectos) en el cuajado de drupas mostraron las mismas tendencias que los
19 índices de primer orden, con mayores efectos totales para los parámetros que controlan

1 la tasa de germinación de polen, seguido por los parámetros de tasa de deposición de
2 polen y daño a los estilos (ver Apéndice C3-6).

3 **Discusión**

4 Aquí desarrollé el primer modelo de simulación para identificar un servicio de
5 polinización óptimo que maximice la calidad de frutos en un cultivo parcialmente
6 dependiente de polinizadores, en términos de densidad e identidad de los visitantes
7 florales, y también considerando los beneficios y costos de la interacción planta-
8 polinizador. Este modelo incluyó los procesos biológicos relevantes de la polinización
9 y post-polinización, para relacionar mecánicamente la polinización con el desarrollo
10 del fruto. El modelo predijo una relación cóncava en la calidad de fruto de frambuesa a
11 medida que se incrementan las visitas de los polinizadores, en concordancia con el
12 modelo conceptual de costos-beneficios propuesto por Simms y Rausher (1987) y Aizen
13 et al. (2014). Este modelo tiene fuertes implicancias para las prácticas de manejo de
14 polinizadores debido a que permite estimar las densidades de abejas necesarias para
15 maximizar la producción y calidad de frutos basándose en principios biológicos sólidos.
16 Aunque el modelo fue creado usando a la frambuesa como cultivo focal, puede ser
17 fácilmente adaptado a cualquier otra especie cultivada.

18 Este modelo fue creado tomando en cuenta funciones y parámetros que
19 describen todos los procesos de polinización y post-polinización involucrados en el
20 desarrollo de frutos y/o semillas. Primero, estimé los niveles de auto-polinización y
21 autogamia, lo cual provee una línea de base para evaluar costos y beneficios netos de las
22 visitas de los polinizadores. Debido a la capacidad de auto-polinizar una fracción de sus
23 pistilos, la probabilidad de que una flor desarrolle un fruto en la frambuesa es
24 independiente de la visita de polinizadores, pero la calidad del mismo sí lo es. Segundo,
25 estimé cómo se incrementa la deposición de polen con la visita de polinizadores. Se
26 observó que la deposición de polen en la superficie estigmática sigue una relación
27 creciente asintótica con las visitas de los polinizadores. Esto implica que los beneficios,
28 desde el punto de vista de la planta, se incrementan con las primeras visitas de
29 polinizadores, pero luego se alcanza un punto de saturación sobre el cual recibir más
30 visitas no va a incrementar la cantidad de polen (ver también Morris et al. 2010).
31 Tercero, estimé el número mínimo de granos de polen depositados en el estigma que
32 gatillan la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, así como el tiempo
33 que requieren los tubos polínicos para fecundar el óvulo. Un efecto de facilitación a

1 medida que aumenta el número de granos de polen para la germinación, particularmente
2 cuando hay muy pocos granos de polen en el estigma (i.e. efectos alelicos), ha sido
3 observado en otras especies (Harder et al. 2016). En la frambuesa, se requieren al
4 menos 10 granos de polen para que al menos uno germine y produzca un tubo polínico.
5 Finalmente, está la relación entre daño a los estilos ya la visita de los polinizadores.
6 Esta función interactúa con las funciones de deposición de polen y germinación para dar
7 la ventana temporal de crecimiento de los tubos polínicos en la cual pueden escapar del
8 daño al estilo y fertilizar el ovulo.

9 Las simulaciones generadas a partir de los dos principales polinizadores de
10 frambuesa (*A. mellifera* y *B. terrestris*) mostraron patrones dependientes de la visita
11 similares. Sin embargo, difirieron sutilmente en el rango de visitas que maximizan el
12 set de drupas y más aún en el umbral de visitas a partir del cual los costos de la
13 interacción sobrepasan los beneficios de la polinización. La simulación de la calidad
14 del fruto de frambuesa cuando *A. mellifera* fue el único visitante floral predijo
15 beneficios máximos en términos de proporción de drupas por fruto entre 6 y 22 visitas
16 durante la vida de una flor (i.e. entre 0.3 y 1.1 visitas por hora). De hecho, valores
17 dentro de estos rangos fueron estimados empíricamente en campos de frambuesas de
18 Europa (Chagnon et al. 1991), como el mínimo número de visitas que las flores de
19 frambuesa necesitan para asegurar una polinización adecuada y maximizar la
20 producción y calidad de frutos. Aunque el máximo beneficio en la producción de
21 frambuesas aparece en un rango relativamente estrecho de visitas (i.e. entre 6 a 22), el
22 modelo predijo que las visitas de las abejas mieleras contribuyen a incrementar la
23 calidad de los frutos de frambuesa hasta aprox. 600 visitas durante la vida de una flor.
24 Un incremento en la cantidad de visitas más allá de este límite implicaría un costo
25 asociado con el daño floral que impediría cualquier beneficio extra provisto por la
26 polinización animal (ver Chagnon et al. 1991 y Aizen et al. 2014). El manejo activo de
27 abejas mieleras, específicamente para la polinización de cultivos, es una práctica común
28 y creciente en la mayoría de los agroecosistemas (Aizen y Harder 2009). Bajo este
29 escenario, poder predecir las densidades de abejas que son necesarias para reducir al
30 mínimo cualquier déficit de polinización que puede afectar la cantidad o calidad de
31 frutos aparece con una prioridad. Como ejemplo, en las 16 plantaciones de frambuesa
32 muestreadas en 2012 (algunas de ellas con manejo activo de abejas mieleras), nunca
33 observamos frecuencias de visita $> 24 \text{ visitas} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ (i.e. 600 visitas durante la

1 vida de una flor), indicando que el número de colmenas utilizadas en los campos de
2 frambuesa incrementan la calidad de los frutos. Sin embargo, mejores resultados
3 podrían obtenerse en algunos campos reduciendo el número de colmenas. Más
4 precisamente, los costos asociados con visitas excesivas no solo se trasladan a frutos de
5 menor calidad, sino que también involucra costos económicos directos para el agricultor
6 en términos de alquiler o compra de colmenas, suplementación de alimento para abejas
7 y mantenimiento de la salud de las abejas. Por lo tanto, en los campos donde la
8 frecuencia de visitas excede aprox. 2 visitas de abejas por flor por hora, los agricultores
9 estarán enfrentando costos extras que no serán retribuidos por ningún beneficio extra.

10 Comparado con *A. mellifera*, menos visitas de *B. terrestris* (i.e. entre 4 y 14
11 visitas durante la vida de una flor, o entre 0.2 y 0.7 vistas por hora) son necesarias para
12 maximizar la calidad de frutos en frambuesa. Sin embargo, debido a que esta abeja es
13 más dañina que *A. mellifera*, el modelo predice que el cuajado de drupas por fruto va a
14 decrecer por debajo del cuajado de drupas autónomo cuando el número de visitas por
15 flor exceda las 428 (i.e. 21.4 visitas por hora). De hecho, en al menos 2 de los 16
16 campos de frambuesa muestreados, observamos frecuencias de visita que excedían este
17 valor, indicando un efecto negativo neto de las visitas de este abejorro en la calidad de
18 los frutos de frambuesa. Paradójicamente, este abejorro fue introducido en Chile para
19 brindar servicios de polinización a cultivos, y ahora, luego de su llegada e invasión en el
20 NO Patagónico (Torreta et al. 2006; Morales et al. 2013) son necesarias prácticas de
21 manejo para controlar su abundancia.

22 En general, las predicciones del modelo se ajustaron relativamente bien a la
23 proporción de drupas promedio observada en los campos de frambuesa con variaciones
24 absolutas en la abundancia de abejas y proporciones de abejas y abejorros. Esto es
25 notable, particularmente debido a que algunos parámetros tuvieron que ser inferidos en
26 vez de estimados, y la frecuencia de visita en los campos de frambuesas usadas para
27 validar el modelo fueron muestreadas durante solo un día durante la temporada de
28 floración (ver Saez et. al. 2014). Por esta razón, concluyo que este modelo constituye
29 una herramienta útil no sólo para desarrollar estrategias de polinización óptimas, sino
30 también para evaluar las consecuencias de los regímenes de polinización en base a un
31 protocolo de muestreo de polinizadores rápido. Debido a que el manejo activo de
32 polinizadores es una práctica común y creciente en la mayoría de los agroecosistemas,
33 el modelo mecanicista de costos-beneficios de polinización que aquí desarrollado para

1 frambuesas representa una primera aproximación para evaluar anticipadamente las
2 consecuencias de diferentes manejos de polinizadores (Velthuis y VanDoorn 2006).
3 Para este caso, el análisis de sensibilidad mostró que el cuajado de drupas en frambuesa
4 es principalmente influenciado por el parámetro de escala (o tasa) de la deposición de
5 polen, el parámetro de tasa de la función que describe la germinación de polen, y el
6 parámetro de tasa del daño a los estilos. Por esta razón, este modelo recomienda el uso
7 y manejo de polinizadores con altas tasas de deposición de polen y bajas de daño floral.
8 Para maximizar la producción de los cultivos dependientes de polinizadores a través de
9 un manejo activo de polinizadores necesitamos tener un entendimiento detallado de
10 todos los procesos biológicos relevantes de la polinización y post-polinización
11 involucrados en el desarrollo del fruto. Aquí, incorporé todos estos principios
12 biológicos en un modelo mecanicista para predecir servicios de polinización óptimos,
13 en términos de densidad e identidad de abejas, para maximizar la calidad de frutos.
14 Aunque este modelo ha sido creado específicamente para predecir costos y beneficios
15 relacionados a la polinización en frambuesa, puede ser fácilmente adaptado a cualquier
16 cultivo dependiente de polinizadores que pueda ser interpretado desde una perspectiva
17 costo/beneficio. Por esta razón, a través de la incorporación de información clave de la
18 biología de los procesos de polinización asociados con diferentes polinizadores se
19 pueden guiar prácticas de manejo de polinizadores eficientes en los agroecosistemas del
20 mundo.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1	Material Suplementario del Capítulo 3 (C3).	
2	Apéndice C3-1. Importancia de la auto-polinización espontánea y autogamia.....	73
3	Apéndice C3-2. Deposición de polen	74
4	Apéndice C3-3. Germinación del polen.....	77
5	Apéndice C3-4. Tiempo desde la polinización a la fecundación del óvulo.....	79
6	Apéndice C3-5. Daño a los estilos.....	81
7	Apéndice C3-6. Análisis de sensibilidad.....	83

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

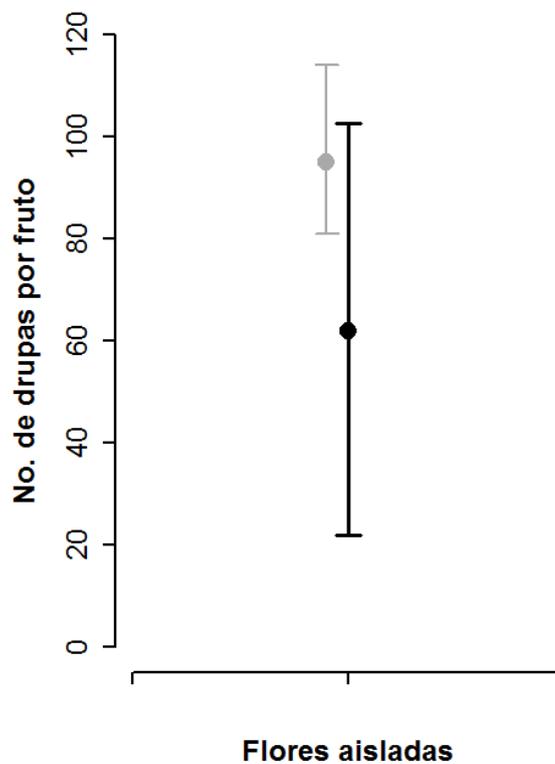
22

23

1 **Apéndice C3-1.** Importancia de la auto-polinización espontánea y autogamia

2 La frambuesa tiene flores hermafroditas auto-compatibles, con numerosos
3 pistilos en la parte central de la flor rodeados por un anillo perisférico de anteras. Esta
4 estructura impide una auto-polinización espontanea completa. Por ello, la mayoría de
5 las frambuesas son altamente auto-compatibles y sus flores forman fruto
6 independientemente de la visita de abejas; sin embargo, las flores no visitadas forman
7 frutos deformados con menos drupas en comparación con flores polinizadas libremente
8 (Cane 2005; Morales 2009). Para estimar el número de drupas que una flor de la
9 variedad Autumn bliss produce en ausencia de visitas de polinizadores, aislé las flores
10 de 10 plantas antes de su apertura con bolsas de tul. Luego coseché los frutos cuando
11 estaban maduros y conté el número de drupas desarrolladas y no-desarrolladas.

12 La figura de abajo muestra el número total de pistilos (= óvulos) por flor en
13 color gris (media y percentiles 2.5 y 97.5), así como el número de drupas por fruto
14 desarrolladas en flores aisladas en negro (media y percentiles 2.5 y 97.5). Debido a la
15 incompleta auto-polinización, en la variedad de frambuesa Autumn bliss el 35% de los
16 pistilos, en promedio, no desarrollan drupa.



17

1 **Apéndice C3-2.** Deposición de polen

2 La deposición de polen en la superficie estigmática es esperado que se
3 incremente con el número de visitas de polinizadores (Vázquez et al. 2005), pero
4 seguimos teniendo un escaso entendimiento de la forma (función) de esta relación (pero
5 ver Morris et al. 2010). Para estimar la forma de esta función marqué flores con
6 etiquetas de papel al momento de apertura (anthesis) y las expuse desde 1 a 48 hs a los
7 visitantes florales. Luego de períodos de exposición aleatorios, corté las flores y las
8 almacené individualmente en tubos eppendorf con alcohol al 70%. En el laboratorio,
9 seleccioné aleatoriamente 10 pistilos de cada flor, los aplasté en un porta y los teñí con
10 la tinción de Alexander (Alexander 1980) para finalmente observarlos bajo microscopio
11 a 400X. Conté el número de granos de polen depositados en la superficie del estigma
12 en estilos no dañados (ver Apéndice C3-5), distinguiendo entre germinados y no
13 germinados a través de la ausencia o presencia del contenido citoplasmáticos,
14 respectivamente (ver Alexander 1980). En total, examiné 590 estilos de 59 flores.

15 Durante el trabajo de campo, también realicé 170 censos de polinizadores para
16 estimar la frecuencia de visita a las flores (i.e. número de visitas \cdot flor⁻¹ \cdot 5 min⁻¹). En
17 cada censo, anoté e identifiqué todos los visitantes florales que contactaban las flores y
18 el número de flores visitadas por cada individuo a un par de tallos de frambuesa vecinos
19 (separados por menos de 20 cm) elegidos aleatoriamente. Dada la variación natural en
20 el número de flores abiertas por tallo, el número de flores observadas en cada censo
21 varió entre 5 y 8. Todos los censos fueron llevados a cabo desde las 10:00 a las 20:00
22 hs durante días soleados o poco nublados con poco o nada de viento, usando diferentes
23 pares de tallos en cada censo. El número total de visitas que cada flor marcada recibió
24 fue estimada multiplicando la cantidad de tiempo que cada flor estuvo expuesta a las
25 visitas de polinizadores (ver arriba) por la frecuencia de visita promedio de
26 polinizadores medida durante el período de exposición. Modelé el número de granos de
27 polen depositado por estigma (np) en función del número de visitas (v) de *Apis mellifera*
28 a las flores de frambuesa (i.e. $np(v)$). Para ajustar esta relación, usé una función de
29 crecimiento exponencial asintótico (Bolker 2008), por lo que:

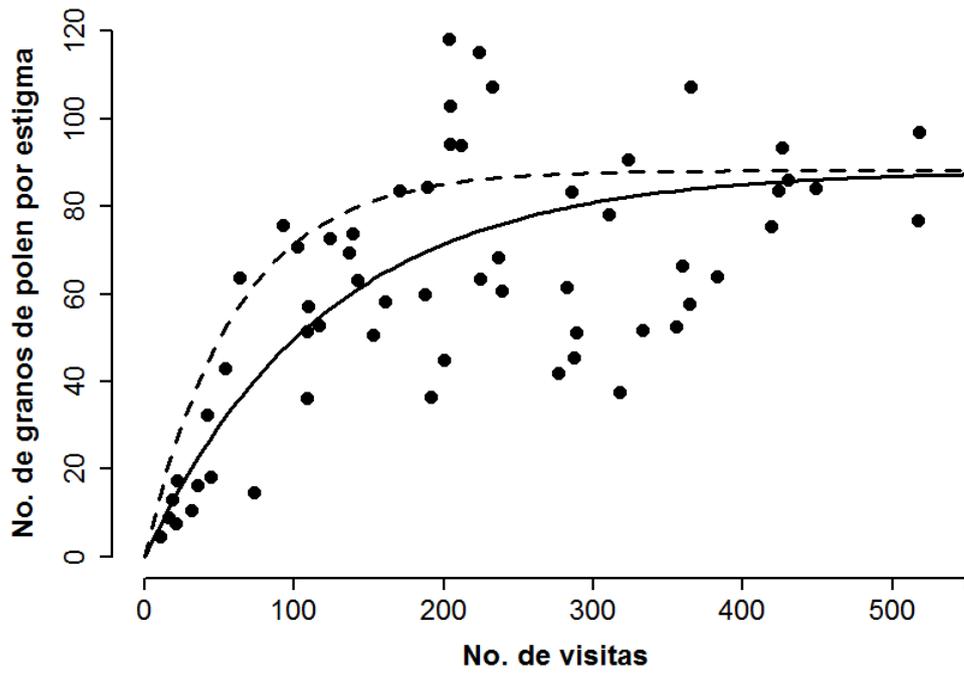
$$30 \quad np(v) = \alpha \cdot (1 - e^{(-\beta \cdot v)})$$

31 Esta función explica de una forma biológica el proceso de deposición de polen,
32 donde el parámetro α representa la asíntota, o capacidad de carga de la superficie

1 estigmática, mientras que β representa la tasa de deposición de polen. Esta función
2 arranca en cero, asumiendo que no hay deposición de polen cuando no hay visitas, y se
3 incrementa hacia la asíntota a medida que el número de visitas aumenta. El parámetro
4 de tasa (β) controla que tan abrupta es la curva a lo largo del eje x , describiendo la tasa
5 de incremento de la deposición de polen por visita de un polinizador.

6 Debido a que el 95% de las visitas a las flores de frambuesa pueden ser
7 atribuidas a *Apis mellifera*, este parámetro β de la deposición de polen vs. número de
8 visitas (i.e. tasa de deposición de polen) estimado por la función de crecimiento
9 exponencial asintótico describe específicamente la eficiencia de polinización de la abeja
10 mielera. La figura de abajo muestra la relación entre el número de granos de polen
11 depositado por estigma con el número de visitas estimado de *A. mellifera* a las flores de
12 frambuesa. Cada punto representa el número promedio de granos de polen por estigma
13 de una muestra de 10 pistilos por flor ($N = 59$). La línea gruesa muestra la curva
14 ajustada, con parámetros (media \pm SE) $\alpha = 88.22 \pm 0.0001$, $\beta = 0.00828 \pm 0.0003$.

15 Debido a que casi todas las visitas observadas a las flores de frambuesa fueron
16 hechas por *A. mellifera*, en contraste con las más o menos comprobables frecuencias de
17 visita de *A. mellifera* y *B. terrestris* observadas en estaciones previas (Morales 2009;
18 Sáez et al. 2014), no pude ajustar una función empírica similar para *B. terrestris*. Por lo
19 tanto, para modelar esta función para el abejorro asumí el mismo valor de asíntota o
20 capacidad de carga del estigma (parámetro α) como la abeja mielera (i.e. la carga
21 máxima de polen es una característica intrínseca del estigma y no del polinizador). Para
22 estimar el parámetro de tasa (i.e. crecimiento de deposición de polen por visita) para *B.*
23 *terrestris* dupliqué la cantidad de polen depositada luego de la primer visita de *A.*
24 *mellifera* (i.e. un trabajo previo de deposición de polen luego de una visita en estigmas
25 vírgenes mostró que el abejorro deposita el doble que la abeja mielera en frambuesa
26 (Willmer et al. 1994)), para finalmente despejar el parámetro de tasa de la función de
27 crecimiento exponencial asintótico. Esta función está representada por la línea punteada
28 en la figura de abajo.



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21

1 **Apéndice C3-3.** Germinación del polen

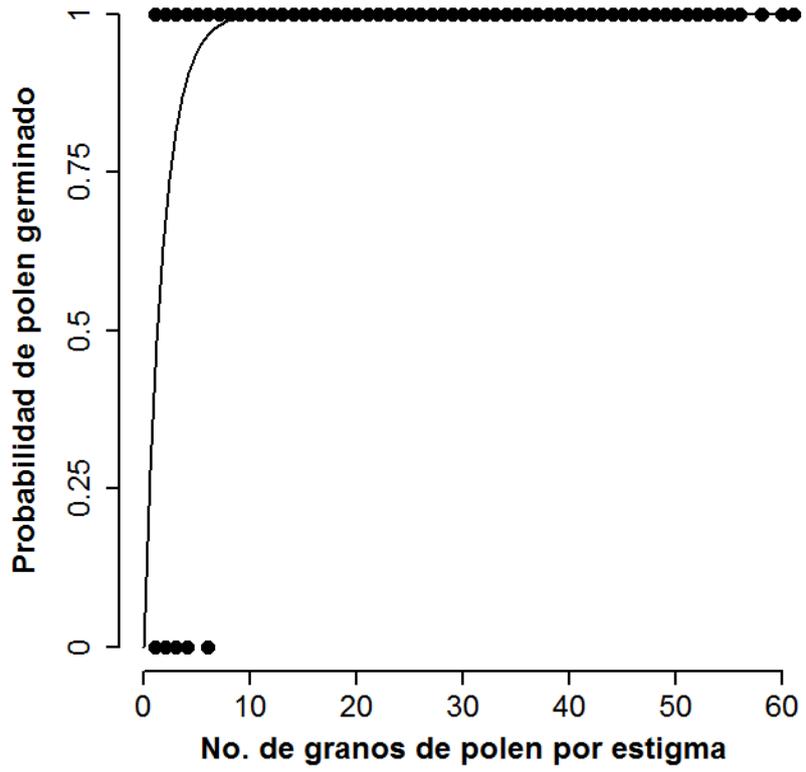
2 Una cantidad mínima de números de granos de polen depositados en el estigma
3 (o carga polínica) es necesaria para que al menos un grano de polen comience a
4 germinar y el tubo polínico crezca (i.e. “efecto masa”, Schemske and Fenster 1983,
5 Cruzan 1986, Shaanker et al. 1988). Usando la base de datos de deposición de polen
6 (ver Apéndice C3-2) estimé el número mínimo de granos de polen depositados en el
7 estigma necesarios para gatillar la germinación del polen en frambuesa.

8 Modelé la presencia/ausencia de polen germinado en el estigma como el
9 resultado de una prueba de Bernoulli, con probabilidad de germinación (g) en función
10 del número total de granos de polen depositado (tp) (i.e. $g(tp)$). Para ajustar esta
11 relación, usé una función de crecimiento exponencial asintótico modificada, por lo que:

12
$$g(tp) = 1 - e^{(-\alpha \cdot tp^\beta)}$$

13 donde α y β son los parámetros de escala y forma, respectivamente. Esta función
14 comienza en cero, asumiendo que no hay germinación cuando no hay granos de polen
15 depositado y se incrementa hasta uno a medida que el número de granos depositados
16 aumenta. El parámetro de escala (o tasa) (α) controla que tan abrupta es la curva a lo
17 largo del eje x , describiendo la tasa de incremento de la deposición de polen por visita
18 de un polinizador; mientras que el parámetro de forma (β) controla la concavidad de la
19 curva al comienzo (i.e. luego de las primeras visitas). Esta función es bien flexible,
20 convergiendo en una función de crecimiento exponencial asintótico cuando $\beta = 1$, y
21 volviéndose sigmoidea para $\beta > 1$.

22 La figura de abajo muestra la relación entre la presencia/ausencia de polen
23 germinado en el estigma con el número de granos de polen depositados por estigma.
24 Los puntos representan estigmas *con* (1) o *sin* (0) granos de polen germinado. La línea
25 negra muestra la curva ajustada con parámetros (media \pm SE) $\alpha = 0.548 \pm 0.237$ y $\beta =$
26 1.019 ± 0.26 . Con solo un grano de polen depositado, el modelo ajustado predice una
27 probabilidad de germinación de 0.42, y se incrementa a casi 0.9 con cuatro granos de
28 polen.



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13

1 **Apéndice C3-4.** Tiempo desde la polinización a la fecundación del óvulo

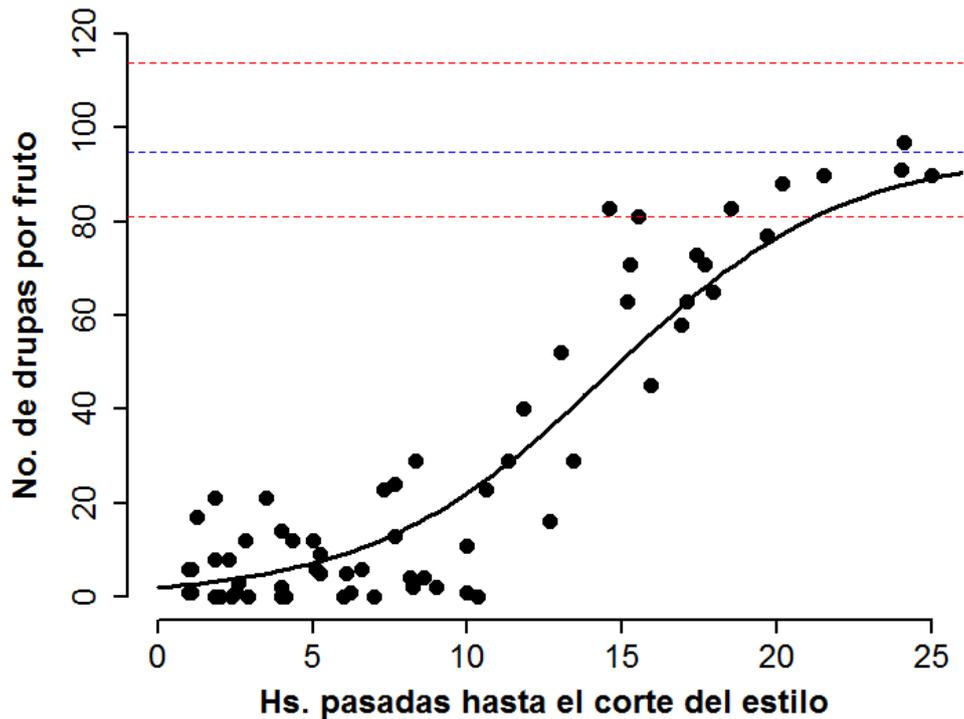
2 El tiempo de paso del tubo polínico desde la polinización hasta la fertilización
3 del óvulo fue estimado mediante polinizaciones manuales en flores vírgenes y corte del
4 estilo a diferentes tiempos. Específicamente, emasculé flores antes de la antesis y las
5 aislamos de los polinizadores con bolsas de tul. Una vez que los estigmas se
6 encontraban receptivos pincelé las flores vírgenes con polen de flores provenientes de al
7 menos cinco otros tallos del mismo campo, y luego las aislé nuevamente. Luego corté
8 los estilos a diferentes tiempos (rango de 1 a 25 horas día) luego de la polinización
9 manual. Una vez que los frutos alcanzaban la madurez los coseché y cuantifiqué la
10 cantidad de drupa desarrolladas bajo lupa.

11 Modé el cuajado de drupas (i.e. D = número de drupas por fruto) en función del
12 tiempo desde la polinización manual (t) (i.e. $D(t)$). Para ajustar esta relación usé una
13 función de crecimiento sigmoidea, por lo que:

14
$$D(t) = D_{max} \cdot \left[\frac{1}{1 + (\alpha \cdot e^{-\beta t})} \right]$$

15 donde D_{max} es la asíntota (o número promedio de pistilos por flor) ($D_{max} = 95$) y los
16 parámetros α y β son la tasa de crecimiento y el punto de inflexión de la función,
17 respectivamente.

18 La figura de abajo muestra la relación entre el número de drupas por fruto y el
19 tiempo que pasó entre la polinización manual y el corte de estilo. Los puntos
20 representan número de drupas por fruto ($N = 58$). La línea negra muestra la ecuación
21 estimada con parámetros (media \pm SE) $\alpha = 45.42 \pm 4.68$ y $\beta = 0.26 \pm 0.009$, mientras
22 que las líneas cortadas azules y rojas representan el promedio y los 0.025 y 0.975
23 cuantiles, respectivamente, de la distribución de óvulos (= pistilos) por flor. La función
24 sigmoideal comienza a saturar (i.e. tasa de crecimiento < 1) a aproximadamente 27 horas.



1

2 Aunque el tiempo requerido para una fertilización completa, y por lo tanto
 3 máximo cuajado de drupas, fue estimado en aproximadamente 27 hs, el daño a los
 4 estilos producido por los visitantes florales ocurre en el top del estilo (i.e. estigma) y no
 5 en la base. Como consecuencia, si el daño ocurre algunas horas luego de la deposición
 6 del polen es altamente probable que el crecimiento del tubo polínico no se vea alterado.
 7 Para estimar esta ventana temporal en la cual el crecimiento del tubo polínico puede ser
 8 interrumpido por el daño a los estilos medí el largo de los estilos dañados y no dañados
 9 en las mismas flores que usé para estimar la incidencia del daño a los estilos (ver
 10 Apéndice 5). El largo promedio \pm SE de estilos no-dañados y dañados fue de $3.00 \pm$
 11 0.06 y 2.82 ± 0.03 mm, respectivamente, por lo que estimo, asumiendo un crecimiento
 12 del tubo polínico constante, que el daño al estilo no afectará el crecimiento del tubo si
 13 este ocurre luego de ~ 1.6 hs luego de la polinización [i.e. $(27 \text{ h} * 0.18)/3$]. Por lo tanto,
 14 en el modelo usamos una ventana temporal de 2 hs en la cual el daño al estilo no
 15 interferirá con la fertilización del óvulo.

16

17

1 **Apéndice C3-5.** Daño a los estilos.

2 Aunque algunos estudios han mostrado que el éxito reproductivo de las plantas
3 puede verse negativamente afectado por visitas excesivas de polinizadores (Young
4 1988; Young & Young 1992; Morris et al. 2010), el mecanismo atrás de este proceso
5 sigue siendo dudoso. Recientemente mostramos (Aizen et al. 2014; Saez et al. 2014,
6 Capítulo 2 de esta Tesis) que las visitas de abejas pueden reducir el éxito reproductivo
7 vía daño floral, específicamente al romper los estilos. Para estimar el costo de las
8 interacciones entre polinizadores y plantas vía daño floral clasifiqué cada estilo
9 colectado y montado en los porta como “no-dañado” o “dañado” en el mismo grupo de
10 flores que usamos para estimar la relación entre deposición de polen y visitas (Apéndice
11 C3-2). El estilo estaba no-dañado si se encontraba intacto y el estigma se encontraba
12 presente, o dañado si el estilo estaba roto y/o el estigma desaparecido.

13 Modelé la condición del estilo (i.e. no dañado, 0, o dañado, 1) asumiendo una
14 prueba de Bernoulli, con probabilidad de daño (d) en función del número de visitas (v)
15 de *Apis mellifera* a las flores de frambuesa (i.e. $d(v)$). Para ajustar esta relación usé una
16 función de crecimiento exponencial asintótica modificada, por lo que:

17
$$d(v) = 1 - e^{(-\alpha \cdot v^\beta)}$$

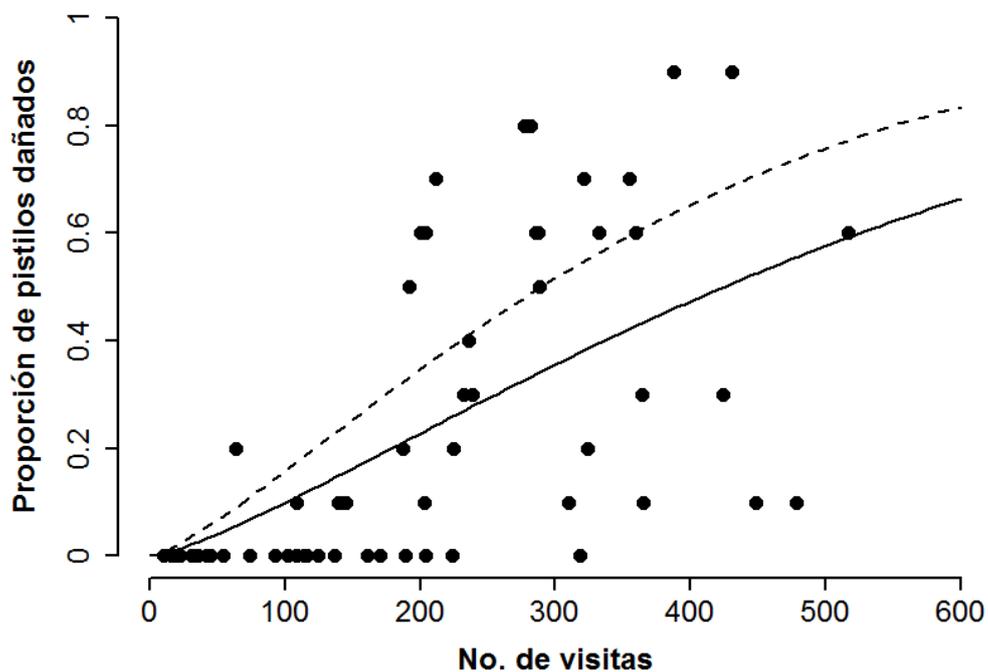
18 donde α y β son los parámetros de escala y forma, respectivamente (ver Apéndice C3-3
19 para más detalles). Esta función comienza en cero, asumiendo que no hay daño cuando
20 no hay visitas a la flor, y se incrementa hasta la probabilidad máxima de uno a medida
21 que se incrementa el número de visitas.

22 La figura de abajo muestra la relación entre la proporción de estilos dañados por
23 flor con el número de visitas estimado de *Apis mellifera* a las flores de frambuesa. Los
24 puntos representan la proporción promedio de estilos dañados de una muestra de 10
25 pistilos por flor (n=59). La línea negra muestra la curva ajustada con parámetros (media
26 \pm SE) $\alpha = 0.00025 \pm 0.000072$ y $\beta = 1.31 \pm 0.054$.

27

28 Debido a que en el campo de estudio que realizamos estos experimentos el 95%
29 de las visitas a las flores de frambuesa fueron hechas por *A. mellifera*, no fui capaz de
30 estimar esta función empíricamente para el abejorro *Bombus terrestris*. Para estimar el
31 parámetro de escala (i.e. tasa de crecimiento del daño a los pistilos por visita) para *B.*

1 *terrestris*, estimé la probabilidad de pistilo de ser dañado luego de la primer visita de *A.*
2 *mellifera*, y multiplicamos ese valor por 1.65 (i.e. *B. terrestris* daña 1.65 veces más que
3 *A. mellifera* basándonos en el estudio previo (ver Sáez et al. 2014 y Capítulo 2), para
4 finalmente resolver la función de crecimiento exponencial asintótico modificada
5 despejando el parámetro de escala (asumiendo el mismo parámetro de forma (β)). Esta
6 curva está representada por la línea punteada en la figura de abajo, la cual indica la
7 relación esperada entre la proporción de estilos dañados por flor y el número de visitas
8 llevadas a cabo por *B. terrestris*.



9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

1 **Apéndice C2-6.** Análisis de sensibilidad.

2 Los análisis de sensibilidad fueron realizados usando los Índices de Sobol's
 3 (Sobol et al. 2007; Saltelli et al. 2010) usando la función “sobol2007” del paquete
 4 “Sensitivity” en R (Pujol et al. 2012). El índice de primer orden representa la
 5 contribución directa de cada factor (parámetro) sobre la varianza de la salida del modelo
 6 (i.e. porcentaje de la varianza total que es explicada por cada parámetro del modelo),
 7 mientras que el índice total es una medida de la varianza debido a cada factor y todas las
 8 interacciones con los otros factores. Aquí varié los parámetros de las funciones que
 9 controlan los procesos de auto-polinización, deposición de polen, germinación de polen,
 10 daño a los estilos y la ventana temporal en la cual el crecimiento de los tubos polínicos
 11 puede ser interrumpido debido al daño en los estilos. El análisis de sensibilidad fue
 12 llevado a cabo en un total de ocho parámetros para cada uno de los cuales definimos un
 13 rango de posibles valores provenientes de una distribución uniforme.

14 **Tabla.** Estimaciones de índices de primer orden y total del análisis de sensibilidad de
 15 Sobol. En negrita se encuentran los valores con mayor sensibilidad.

Parámetro	Descripción	Rango	Estimación de primer orden	SE de primer orden	Estimación total	SE total
λ_{A1}	Auto-polinización	0-1	0.027	0.018	0.090	0.016
α_{A2}	Asíntota de la función exponencial asíntótica de la deposición de polen	30-200	0.053	0.021	0.143	0.020
β_{A2}	Tasa de la función exponencial asíntótica de la deposición de polen	0-0.1	0.180	0.029	0.318	0.028
α_{A3}	Tasa de la función exponencial modificada de la germinación de polen	0-0.1	0.311	0.030	0.414	0.030
β_{A3}	Forma de la función exponencial modificada de la germinación de polen	0.5-2	0.073	0.027	0.271	0.025
α_{A4}	Tasa de la función exponencial modificada del daño a los estilos	0-0.1	0.180	0.033	0.342	0.031
β_{A4}	Forma de la función exponencial modificada del daño a los estilos	0.5-2	0.004	0.018	0.103	0.017
t_{A5}	Ventana temporal luego de la deposición de polen para que el daño al estilo interfiera con la fertilización del ovulo	1-8	0.026	0.019	0.123	0.017

16

17

Capítulo 4.

1

2

3

4 **El abejorro invasor reduce la disponibilidad de néctar**
5 **para las abejas mieleras a través del robo a pimpollos**
6 **de frambuesa.**

7



8

9

10 *El contenido de este capítulo se encuentra en revisión como:*

11 Sáez A., Morales C.L., Garibaldi L.A. & Aizen M.A. Invasive bumble bees reduce
12 nectar availability for honey bees by robbing flower buds. *Basic and Applied Ecology*.

1 **Resumen**

2 La introducción de abejas para la polinización de cultivos es una práctica aplicada en
3 todo el mundo, generando severas invasiones tanto en ambientes naturales como en
4 agroecosistemas, con impactos tanto ecológicos como económicos. Aquí estudié cómo
5 el robo a pimpollos por el abejorro invasor *Bombus terrestris* afecta la disponibilidad de
6 néctar para las abejas mieleras (*Apis mellifera*). Estimé la proporción de pimpollos
7 robados y disponibilidad de néctar en flores y pimpollos (tanto robados como no
8 robados) en 16 campos de frambuesa a lo largo de gradientes de abundancia de
9 abejorros invasores y abejas mieleras en el NO Patagónico. Además, medí la
10 producción y reposición de néctar en flores que se desarrollaron a partir de pimpollos
11 que fueron robados y comparé estas medidas con las de pimpollos no robados. La
12 proporción de pimpollos robados en una plantación se incrementa con la abundancia del
13 abejorro, pero no con la de la abeja mielera. Al momento de antesis, las flores
14 provenientes de pimpollos que fueron robados una vez contenían la mitad de néctar, y
15 produjeron dos tercios de néctar comparado con flores cuyos pimpollos no fueron
16 robados. Por lo tanto, altas abundancias de este abejorro invasor pueden reducir la
17 cantidad de recursos florales para las abejas mieleras a través del robo a pimpollos. Este
18 estudio revela un nuevo impacto negativo de la invasión de abejorros que podría
19 potencialmente afectar la producción de miel.

20

21

22

23

24

25

26

27

1 **Introducción**

2 Las invasiones biológicas generan costos tanto ecológicos, sociales como
3 económicos a través de sus múltiples impactos negativos sobre los ecosistemas
4 naturales y agrícolas (Pimentel 2001; Perrings et al. 2002; Simberloff et al. 2013). La
5 invasión de visitantes florales se ha incrementado desde su introducción intencional
6 para la polinización de cultivos en la gran mayoría de los agroecosistemas (Velthuis y
7 van Doorn 2006). Particularmente, los abejorros (y en especial *Bombus terrestris*) están
8 siendo criados y vendidos con más frecuencia, volviéndose altamente invasores en
9 algunas regiones (Matsumura et al. 2004; Schmid-Hempel et al. 2007, 2014; Dafni et al.
10 2010; Morales et al. 2013). Muchos estudios han demostrado los impactos deletéreos
11 de la invasión de *B. terrestris* en la fauna nativa de abejas (Morales et al. 2013;
12 Schmid-Hempel et al. 2014), en la reproducción de plantas silvestres (Dohzono et al.
13 2008), e incluso en la producción y calidad de cultivos (Aizen et al. 2014; Saéz et al.
14 2014, Capítulo 2 de esta Tesis). Sin embargo, no existen estudios evaluando los
15 impactos potenciales de los abejorros invasores sobre las abejas mieleras (*Apis*
16 *mellifera*).

17 Los impactos negativos de las especies invasoras en diferentes componentes de
18 la biota nativa e introducida, incluyendo especies de animales y plantas domesticados
19 con fines agropecuarios, podrían estar mayormente relacionadas a la extremadamente
20 alta densidad poblacional que pueden alcanzar (Kearn and Crawley 2002, Aizen et al.
21 2014). Esta alta abundancia de abejas invasoras, como *B. terrestris*, podrían
22 incrementar la competencia por recursos con otras especies de abejas. Particularmente,
23 la apicultura depende de los recursos florales (principalmente néctar y polen)
24 recolectado por las abejas mieleras para producir miel u otros productos. El
25 comportamiento cooperativo de la abeja mielera (*Apis mellifera*), una especie con una
26 estructura social muy desarrollada y compleja, la hace un eficiente competidor por
27 recursos florales de alta calidad, particularmente de aquellos que se encuentran
28 altamente agrupados en el espacio como es el caso de la mayoría de los cultivos con
29 flor. Sin embargo, la invasión de un competidor floral superior capaz de adelantarse en
30 el uso de los recursos, podría potencialmente reducir la disponibilidad del mismo,
31 afectando la producción de miel. Aunque estudios previos han mostrado que la abeja
32 mielera manejada puede limitar la colecta de recursos y reproducción de abejorros

1 nativos (Thomson 2004; Goulson & Sparrow 2009), el efecto recíproco de abejorros
2 invasores en la colecta de recursos por abejas mieleras permanece desconocido.

3 Muchas abejas de gran tamaño, incluyendo muchas especies de abejorros como
4 *B. terrestris*, *B. lapidaries* y *B. lucorum*, pueden perforar la base del perianto de flores
5 tubulares para ganar acceso al néctar, el cual de otra manera no sería accesible a ellos
6 debido a rasgos funcionales incompatibles (Inouye 1980; Inouye 1983, Garibaldi et al.
7 2015). Particularmente, este “robo de néctar” ocurre en flores de corolas largas que
8 impiden o dificultan el acceso legítimo de los polinizadores al néctar producido por el
9 en la base de la flor (Roubik et al. 1985, Soberón & Martínez del Río 1985). Como
10 consecuencia, el agujero producido en la base del perianto provee a los abejorros una
11 ventaja competitiva en el acceso a néctar sobre otros visitantes florales. Si bien, la
12 mayoría del néctar es usualmente removido por el robador primario (Irwin 2000; Dedej
13 & Delaplane 2005), la perforación realizada por el mismo también provee una
14 oportunidad para visitantes incapaces de hacer este tipo de agujeros para robar el néctar
15 (i.e. robo secundario), como es el caso de las abejas mieleras (Dedej & Delaplane 2005)
16 (Maloof & Inouye 2000; Deleplane & Mayer 2000; Dedej & Delaplane 2005).

17 A nivel de la flor, el robo de néctar puede generar diversas respuestas en la
18 producción de esta recompensa, desde sobre-compensación (flores robadas producen
19 más néctar que flores no robadas) (Roubik et al. 1985, see also Maloof & Inouye 2000)
20 hasta sub-compensación (flores robadas producen menos néctar que flores no robadas)
21 (González-Gómez & Valdivia 2005; Castro et al. 2008). Los mecanismos que subyacen
22 a la sobrecompensación en la producción de néctar en flores robadas siguen estando
23 poco claros (see Maloof & Inouye 2000). En algunas instancias, este puede ser un
24 efecto aparente ya que los robadores preferentemente visitan flores con tasa de
25 producción intrínsecas más altas, lo que podría explicar las mayores tasas de reposición
26 de néctar encontradas en flores robadas (Maloof & Inouye). Por otro lado, los
27 robadores pueden dañar los nectarios mientras roban las flores llevando a una reducción
28 (i.e. sub-compensación) en la producción de néctar (González-Gómez & Valdivia 2005;
29 Traveset et al. 1998).

30 Aunque el robo de néctar ha sido mayormente estudiado desde un enfoque más
31 comportamental y evolutivo, son necesarios estudios que lo aborden desde una
32 perspectiva práctica debido a las posibles consecuencias económicas para la apicultura,

1 particularmente cuando involucra una explotación intensiva sobre un cultivo. Aquí me
2 pregunto cómo el robo primario de pimpollos florales por un abejorro invasor puede
3 disminuir la disponibilidad de néctar para las abejas mieleras manejadas. Si este robo
4 produce una sobre-compensación en la producción de néctar, las abejas mieleras
5 podrían verse beneficiadas debido a un incremento en la disponibilidad de recursos; sin
6 embargo, si ocurre una sub-compensación los apicultores podrían verse negativamente
7 afectados por una menor disponibilidad de recursos que podría afectar eventualmente la
8 producción de miel.

9 Aunque el robo de néctar en flores totalmente expandidas es un fenómeno
10 común (Rojas-Nossa et al. 2015), y sus consecuencias para la subsecuente producción
11 de néctar y éxito reproductivo ha sido ampliamente evaluado en una diversidad de
12 especies y sistemas (ver Maloof & Inouye 2000 y referencias allí), tanto el robo de
13 néctar de pimpollos florales como sus consecuencias en la disponibilidad de néctar y
14 subsecuente producción y reposición nunca ha sido abordado. Aquí hipotetizo que la
15 competencia por recursos entre abejorros y abejas mieleras manejadas podría
16 desencadenar el robo de néctar de pimpollos florales como una estrategia para captar
17 recursos por parte del abejorro, derivando en una sub-compensación de néctar y,
18 consecuentemente, reduciendo la disponibilidad de recursos para las abejas mieleras.
19 Específicamente, me hice las siguientes preguntas: (i) ¿puede la abundancia e identidad
20 de abejas (abejorros o abejas mieleras) afectar la intensidad del robo a los pimpollos?,
21 (ii) ¿puede afectar el robo a los pimpollos la cantidad de néctar disponible y la
22 subsecuente producción en flores abiertas? y finalmente, (iii) ¿cuánto afecta el robo a
23 pimpollos la disponibilidad de recursos para las abejas mieleras?

24 **Materiales y Métodos**

25 *Sistema de estudio*

26 La producción de miel es una importante actividad económica en los valles
27 intermontanos de los Andes Patagónicos, Argentina. Los apicultores ubican las
28 colmenas de abejas mieleras próximas a las plantaciones de frambuesa, el cultivo
29 regional más importante, para incrementar la producción de miel (Secretaría de
30 Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos 2006; Instituto Interamericano de
31 Cooperación para la Agricultura 2012). El néctar y polen de las frambuesas representa
32 unos los principales recursos florales colectados por las abejas mieleras en estos valles,

1 particularmente en el verano tardío cuando otros recursos florales son escasos (C.
2 Morales, sin publicar). En los Andes Patagónicos, las flores de frambuesa son visitadas
3 casi exclusivamente por dos abejas no-nativas, la abeja mielera de colmenas manejadas
4 y el abejorro invasor *B. terrestris* (Morales 2009; Sáez et al. 2014, Capítulo 2 de esta
5 Tesis). Este abejorro llegó a la Patagonia Argentina en 2006 luego de haber sido
6 introducido en el país vecino (Chile) para la polinización de cultivos en 1997 (Torretta,
7 Medan & Abrahamovich 2006). Actualmente, este abejorro es, al menos por un orden
8 de magnitud, el visitante floral más abundante en la región Patagónica, donde roba
9 néctar de más de una docena de especies de plantas nativas y exóticas (Morales 2015;
10 Morales et al. en prep.). Aunque este abejorro es un visitante floral legítimo en las flores
11 de frambuesa, también fue observado robando néctar de los pimpollos perforando el
12 caliz y corola de las flores antes de su apertura (ver Sáez et al. 2014) y, por lo tanto,
13 accediendo a los recursos florales antes de ser ofertados para los visitantes florales
14 legítimos.

15 *Cultivo de estudio*

16 La frambuesa, *Rubus idaeus* (Rosaceae) es un arbusto de zonas templadas que se
17 cultiva por sus frutos (Crane & Walker 1984). Sus flores presentan numerosos pistilos
18 en la parte central de la flor, rodeados por un anillo de tejido nectarífero y un anillo
19 externo de anteras. Cuando las flores abren, el néctar se encuentra expuesto libremente
20 a los polinizadores. El nectario produce grandes cantidades de néctar con alto contenido
21 de azúcar (10-20 μ L y 35-60%, respectivamente) (Haragsimova-Neprasova 1960;
22 Simidchiev 1976), y con una tasa de secreción de néctar decreciente a lo largo de los 2.5
23 días promedio de la vida de la flor (Simidchiev 1976; Willmer 1994). Por ello, las
24 abejas encuentran a las flores de frambuesa atractivas tanto en términos de accesibilidad
25 como recompensa.

26 (i) ¿Puede la abundancia e identidad de abejas (abejorros o abejas mieleras) afectar la
27 intensidad del robo a los pimpollos?

28 El trabajo de campo fue llevado a cabo durante el verano austral del año 2014 (de
29 Enero a Febrero) en 16 plantaciones de frambuesa localizadas en el Noroeste
30 Patagónico, Argentina, ubicadas en las cercanías del Parque Nacional lago Puelo y otras
31 áreas de conservación. Por ello, estas plantaciones se encontraban rodeadas, o al lado
32 de, grandes extensiones de bosque del Dominio Sub-Antártico (Cabrera 1976). Los

1 campos de frambuesa muestreados variaron desde 0.1 a1 hectárea, todos plantados con
2 la variedad “Autumn bliss”. Estos campos también variaron en el número de colmenas
3 colocadas en sus márgenes, desde cero a 30 aproximadamente. Las distancias mínimas
4 entre los campos muestreados fue siempre mayor a 1.5 km, y en promedio 12.2 km,
5 excediendo de esta la distancia media esperada de forrajeo de la mayoría de las abejas
6 sociales (Walther-Hellwig & Frankl 2000; Steffan-Dewenter & Kuhn 2003; Osborne et
7 al. 2008). Por lo tanto, cada campo puede ser considerado como una réplica
8 independiente en cuanto a su fauna de abejas. Todas las medidas fueron tomadas bajo
9 buenas condiciones climáticas (i.e. días soleados o parcialmente nublados, con escaso
10 viento) desde principios de Enero a principios de Marzo, entre las 10:00 y las 20:00 hs.

11 Cuantifiqué el robo a pimpollos a través de la selección aleatoria de aprox. 30
12 pimpollos en estado avanzado (i.e. ~3 hs antes de su apertura) en cada campo de
13 frambuesa totalizando 509 pimpollos. Cada campo fue muestreado en dos días
14 diferentes durante la temporada de muestreo, censando aprox. 15 pimpollos a la mañana
15 (o tarde) de un día y aprox. 15 a la tarde (o mañana) del otro día. Cada pimpollo fue
16 clasificado como robado, si el perianto presentaba un agujero, o no robado, si no había
17 agujero (Imagen 1).

18 **Imagen 1.** Pimpollos de frambuesa no robados por abejas (panel izquierdo) y luego de
19 ser robados (panel derecho).



1 Para estimar la abundancia de abejas en cada plantación de frambuesa, realicé
2 censos de polinizadores durante los cuales registré el número de flores y pimpollos
3 (robados y no robados) visitados por cada especie de polinizador a un par de vástagos
4 de frambuesa (separados por < 20 cm) durante un período de 5 minutos (i.e., no. visitas
5 $\text{flor}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$). El número de flores receptivas, pimpollos robados y no robados por
6 tallo, varió entre censos desde 5 a 8, para flores receptivas, 0 a 3 para pimpollos no
7 robados, y 0 a 3 para pimpollos robados. Dentro de cada campo, cada censo involucró
8 un par de tallos diferentes, seleccionados aleatoriamente. Cada campo fue muestreado
9 en dos días diferentes durante la temporada de floración (i.e. los mismos en que se
10 cuantificó el robo de pimpollos), realizando uno de los días 10 censos durante la
11 mañana (entre las 10 y las 13hs) y el otro 10 durante la tarde (entre las 15 y las 19 hs),
12 totalizando de esta forma 320 censos.

13 Evalué si el robo a pimpollos implica el acceso a una mayor cantidad de néctar en
14 comparación con flores abiertas, midiendo la cantidad de néctar ofrecido por flores y
15 pimpollos (tanto robados como no robados). El néctar fue extraído con microcapilares
16 repetidamente del nectario de flores y pimpollos seleccionados aleatoriamente hasta que
17 no se pudo extraer más néctar. Usé microcapilares de $0.5 \mu\text{l}$ para las flores receptivas y
18 de $2 \mu\text{l}$ para pimpollos (tanto robados como no robados). Para medir néctar en los
19 pimpollos robados utilicé la perforación realizada por el abejorro para insertar el
20 microcapilar y alcanzar el nectario, mientras que para los pimpollos sanos el néctar fue
21 extraído a través de una perforación en el perianto realizada con el microcapilar. En
22 cada campo, medimos néctar en 30 flores receptivas, 15 durante la mañana y 15 durante
23 la tarde, totalizando 575 muestras, y en 20 pimpollos (la mitad robados), 10 de ellos
24 durante la mañana y 10 durante la tarde (excepto por dos campos que no fueron
25 muestreados), totalizando 186 medidas para pimpollos no robados y 217 para robados.
26 Cada campo fue muestreado en dos días diferentes durante la temporada de floración,
27 midiendo néctar durante la mañana o la tarde en cada día de muestreo. Aquí usamos el
28 volumen de néctar como un “proxy” de la disponibilidad de recursos, ya que el mismo
29 está relacionado fuertemente con la cantidad de azúcar total (ver Apéndice C4-1 para
30 más detalles).

31 Evalué la influencia de la abundancia de *B. terrestris* y *A. mellifera* (estimado como
32 frecuencia de visita a las flores, ver arriba) sobre la probabilidad de que un pimpollo se
33 encuentre robado con modelos lineales generalizados mixtos. El análisis de datos fue

1 realizado con la función *lmer* del paquete *lme4* (Bates et al. 2015) del software R
2 (versión 2.15.1). Debido a que la variable respuesta (i.e. estado del pimpollo) responde
3 a un proceso de prueba de Bernoulli (i.e. robado vs no robado), en el modelo asumí una
4 distribución del error Binomial con una función de enlace *logit*. La abundancia de
5 abejorros y abejas fueron incluidas como efectos fijos aditivos y cada campo como
6 efecto aleatorio, permitiendo que la ordenada al origen varíe entre campos. Los
7 coeficientes parciales de la abundancia de abejorros y abejas fueron usados para
8 discriminar entre los diferentes efectos de los dos principales visitantes florales.
9 Finalmente, estimé el factor de inflación de varianza (VIF) para evaluar
10 multicolinealidad entre las variables predictoras. Aunque la frecuencia de visita de *A.*
11 *mellifera* y *B. terrestris* presentó una correlación negativa baja (ver resultados), el VIF
12 fue estimado en 1.38, mostrando bajo efecto de inflación de varianza en los SE de los
13 coeficientes estimados (ver Neter et al. 1989; Hair et al. 1995; StataCorp 1997).

14 También se evaluó la influencia de las tres categorías de los estadios florales (i.e.
15 flores receptivas, pimpollos no robados y robados) en la disponibilidad de néctar con
16 modelos lineales generalizados mixtos. El análisis de datos fue llevado a cabo usando
17 la función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro et al. 2015) en el software R (versión 2.15.1),
18 asumiendo una distribución del error Gaussiana. El estado de la flor fue incluido como
19 efecto fijo, y cada campo como efecto aleatorio, permitiendo que la ordenada al origen
20 varíe entre campos. Debido a que el modelo no cumplía con los supuestos de
21 normalidad del error y homogeneidad de varianza, corrí nuevamente el análisis con la
22 variable respuesta (i.e. μl de néctar) transformada como $\ln + 1$ y usando un modelo de
23 heterogeneidad de varianza (función *VarIdent* del paquete *nlme*), lo cual incrementó el
24 ajuste del modelo (menor AIC) y mejoró los supuestos del modelo.

25 **(ii)** ¿Puede afectar el robo los pimpollos la cantidad de néctar disponible y la
26 subsecuente producción en flores abiertas?

27 El trabajo de campo fue realizado durante el verano austral del 2015 (Enero –
28 Febrero) en la chacra “San Felipe” (42° 0.582` S, 71° 31.677` W), una de las 16 chacras
29 muestreadas durante el año previo. Todas las medidas fueron tomadas bajo buenas
30 condiciones meteorológicas para abejas forrajeadoras (i.e. en días soleados o poco
31 nublados y con poco viento) desde las 10:00 a las 20:00 hs durante el principal período
32 de floración (desde mediados de enero a mediados de febrero).

1 Para cuantificar los efectos del robo de néctar en los pimpollos sobre la
2 producción y reposición de néctar realicé dos ensayos separados. Primero, para estimar
3 la cantidad de néctar recolectado por el primer robador, comparé la disponibilidad de
4 néctar en 30 pimpollos no robados (haciendo un agujero en el perianto con el
5 microcapilar usado para recolectar néctar) con el remanente de néctar presente luego del
6 primer robo de un abejorro en 15 pimpollos robados (insertando el microcapilar por la
7 perforación realizada por el abejorro). Segundo, para estimar las consecuencias del
8 robo de néctar sobre la producción subsecuente aislé 20 pimpollos no robados y 15
9 robados (luego del primer robo) con tul. Luego medí la cantidad de néctar producido y
10 concentración de azúcar con ayuda de un refractómetro al momento de la apertura de la
11 flor, extrayendo todo el néctar con un microcapilar de 2 μ l. Luego de la extracción aislé
12 las flores nuevamente y re-muestreamos las mismas flores en secuencias periódicas de 4
13 hs, cuantificando cantidad de néctar y concentración de azúcar para estimar la
14 reposición.

15 Para estimar la cantidad de néctar removida por el primer robador, comparé el
16 volumen de néctar en pimpollos no robados vs. el volumen remanente luego del primer
17 robo con ANOVA de una vía, utilizando la función *lm* del software R (versión 2.15.1) y
18 asumiendo una distribución del error Gaussiana. El volumen de néctar fue incorporado
19 como variable respuesta y el estado del pimpollo (i.e. robado / no robado) como
20 predictor (i.e. variable categórica con dos niveles). La variable respuesta (i.e. volumen
21 de néctar) fue transformada como $\ln + 1$ para cumplir con el supuesto de normalidad.

22 Para estimar el efecto del robo a los pimpollos en la producción y reposición de
23 néctar evalué si la producción y reposición dependía de si el pimpollo había sido
24 previamente robado o no, utilizando la función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro et al.
25 2015) del software R (versión 2.15.1), asumiendo una distribución Gaussiana del error.
26 Debido que se tomaron medidas repetidas de las mismas flores incorporé “flor” como
27 efecto aleatorio en el modelo, permitiendo que la ordenada al origen varíe entre flores.
28 La variable respuesta (i.e. volumen de néctar) fue transformada como $\ln + 1$ para
29 cumplir con el supuesto de normalidad. Además, debido a que se tomaron medidas
30 repetidas de néctar de las mismas flores en el tiempo (en secuencias de 4 hs), evalué la
31 presencia de auto-correlación temporal en los residuos normalizados de nuestro modelo
32 de efectos mixto utilizando la función de auto-correlación (ACF) (Zuur et al. 2009).
33 Debido a que el gráfico de ACF no mostró violación alguna de los supuestos de

1 independencia (i.e. el desfasaje temporal no mostró patrones en los residuos), no hubo
2 necesidad de incorporar una estructura de correlación temporal en nuestro modelo.

3 (iii) ¿Cuánto afecta el robo a pimpollos la disponibilidad de recursos para las abejas
4 mieleras?

5 Se estimó la producción de néctar por hectárea de frambuesa para los
6 polinizadores en campos de frambuesa con 0, 7.5, 40 y 80 % de sus pimpollos robados
7 por *B. terrestris*. Estos valores fueron elegidos para representar los rangos observados
8 de intensidad de robo. Para alcanzar este objetivo, combiné información del número de
9 flores por hectárea, cantidad de néctar producido por las flores durante su vida, tanto de
10 flores cuyos pimpollos fueron no robados como robados (ver sección (ii) de M y M), y
11 la probabilidad de que un pimpollo sea robado (ver sección (i) en M y M). El número
12 de flores por hectárea fue estimado a través de la multiplicación del promedio de flores
13 totales por metro de hilera por los metros de hilera de una plantación típica de
14 frambuesa (obs. pers.). Para estimar estos valores, conté el número total de flores por
15 tallo (i.e. incluyendo pimpollos, flores abiertas y frutos en desarrollo) así como el
16 número de tallos por metro, llevando a cabo ocho réplicas aleatorias por campo, en cada
17 uno de las 16 plantaciones de frambuesa muestreadas.

18 Para cada set de datos mencionados arriba (i.e. número total de flores por
19 hectárea, néctar producido por flores, ya sea originadas de pimpollos robados o no),
20 generé 1000 valores medios usando “bootstrap” con reemplazo (función *sample* en el
21 software R, ver Crawley 2007). Finalmente, multiplicamos estos tres vectores de
22 pseudo-medias, para estimar valores esperados de producción de néctar bajo diferentes
23 intensidades de robo a pimpollo como:

$$24 \quad \text{Producción de néctar (ha)} = nF * (NRF * (1-p)) * (RF * (p))$$

25
26 donde nF es el número promedio de flores de frambuesa por hectárea de frambuesa;
27 NRF , es la producción de néctar en flores no robadas; RF es la producción de néctar en
28 flores cuyos pimpollos fueron robados; y p es la probabilidad de robo (i.e. 0, 0.075, 0.4
29 y 0.8).

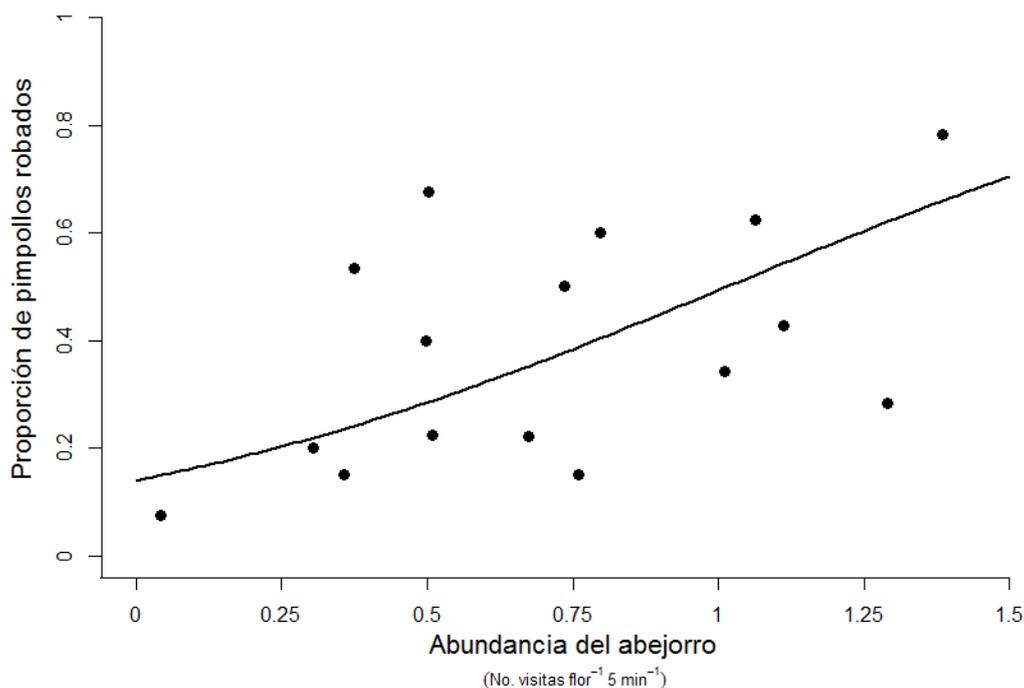
31 **Resultados**

32 En total observamos 2394 vistas a flores receptoras de frambuesa luego de 26 hs
33 de observación. La abeja mielera (*A. mellifera*) y el abejorro invasor (*B. terrestris*)

1 llevaron a cabo el 52 y 46% de las visitas, respectivamente, mientras que las abejas
2 silvestres realizaron el 2% restante. Las frecuencias de visitas de las abejas mieleras y
3 de los abejorros estuvieron negativamente correlacionada (Pearson's $r = -0.52$, $n = 16$,
4 $P=0.03$). La mínima, media y máxima frecuencia de visita a flores a lo largo de los
5 campos de frambuesa fueron 0.7, 1.5, y 2.6 visitas \cdot flor⁻¹ \cdot 5 min⁻¹. El volumen de néctar
6 promedio disponible en flores receptivas fue de 0.057 ± 0.006 μ l.

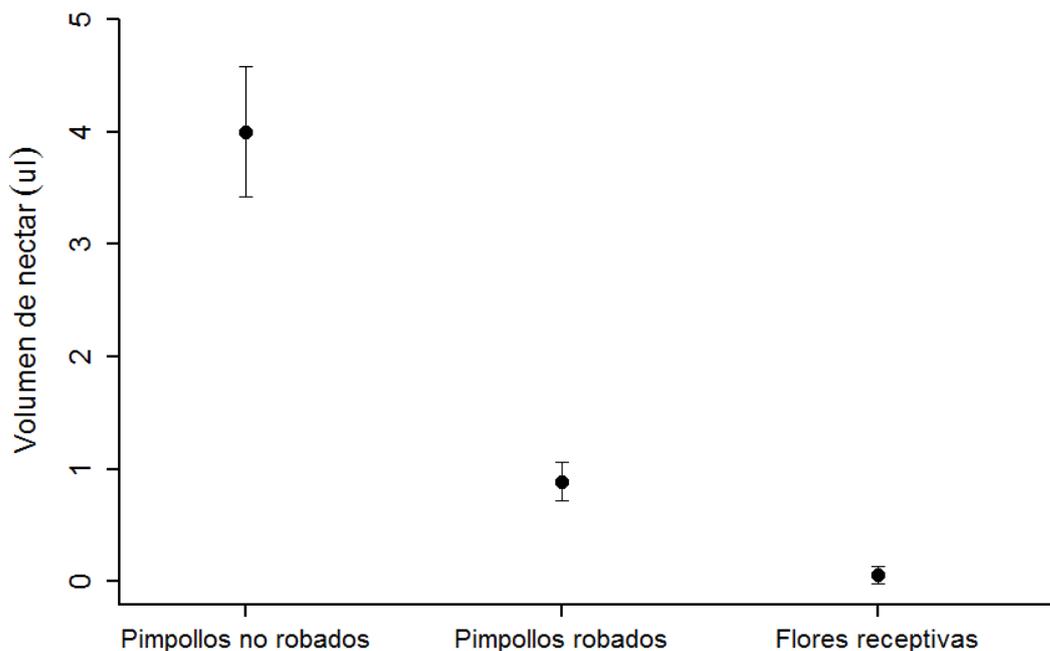
7 A lo largo de los campos de frambuesa, la probabilidad de que un pimpollo sea
8 robado se incrementa significativamente a medida que aumenta la frecuencia de visitas
9 del abejorro, pero no la de las abejas mieleras (en escala *logit*, $\beta= 1.79$, $SE= 0.68$, $P=$
10 0.008 , y $\beta = 0.48$, $SE = 0.45$, $P= 0.29$, respectivamente) (Fig. 1). De hecho, durante los
11 censos de visita el abejorro fue la única especie realizando robo primario a los
12 pimpollos para ganar acceso al néctar. En promedio, el 70% de los pimpollos se
13 encontraron robados en los campos con mayores frecuencias de visita del abejorro,
14 mientras que sólo el 15% de los pimpollos se encontraron robados en los campos con
15 menor abundancia (Fig.1).

16 **Figura 1.** La proporción de pimpollos robados se incrementa con la abundancia del
17 abejorro invasor *Bombus terrestris* a lo largo de las 16 plantaciones de frambuesa. La
18 proporción de pimpollos robados fue estimada a partir de una muestra de 30 pimpollos
19 por plantación. La línea continua muestra la curva estimada por el modelo binomial.



1 El volumen de néctar en pimpollos no robados fue, en promedio, 70 veces mayor
 2 que el disponible en flores receptivas apenas abren (en escala $\ln, \beta= 1.27, SE = 0.05, t=$
 3 $22.32, P<0.001$) con una media ($\pm SE$) de $4.0 \pm 0.29 \mu\text{l}$ de néctar por pimpollo (Fig. 2).
 4 Una vez que un pimpollo fue robado, tanto abejas mieleras como abejorros continúan
 5 cosechando néctar del pimpollo a través del agujero generado por el primer robador (i.e.
 6 robo secundario). Sin embargo, los abejorros re-visitan los pimpollos robados 2.2 veces
 7 más frecuentemente que las abejas mieleras. El volumen de néctar disponible en
 8 pimpollos robados fue, en promedio, 15 veces mayor que el disponible en las flores
 9 receptivas (en escala $\ln, \beta= 0.44, SE = 0.03, t= 13.34, P< 0.001$), pero 4.5 veces menor
 10 que en los pimpollos no robados, con una media ($\pm SE$) de $0.89 \pm 0.08 \mu\text{l}$ de néctar por
 11 pimpollo robado (Fig. 2).

12 **Figura 2.** Disponibilidad de néctar en pimpollos no robados, pimpollos robados y flores
 13 receptivas. Los puntos representan medias $\pm 2SE$ en volumen de néctar (μl).

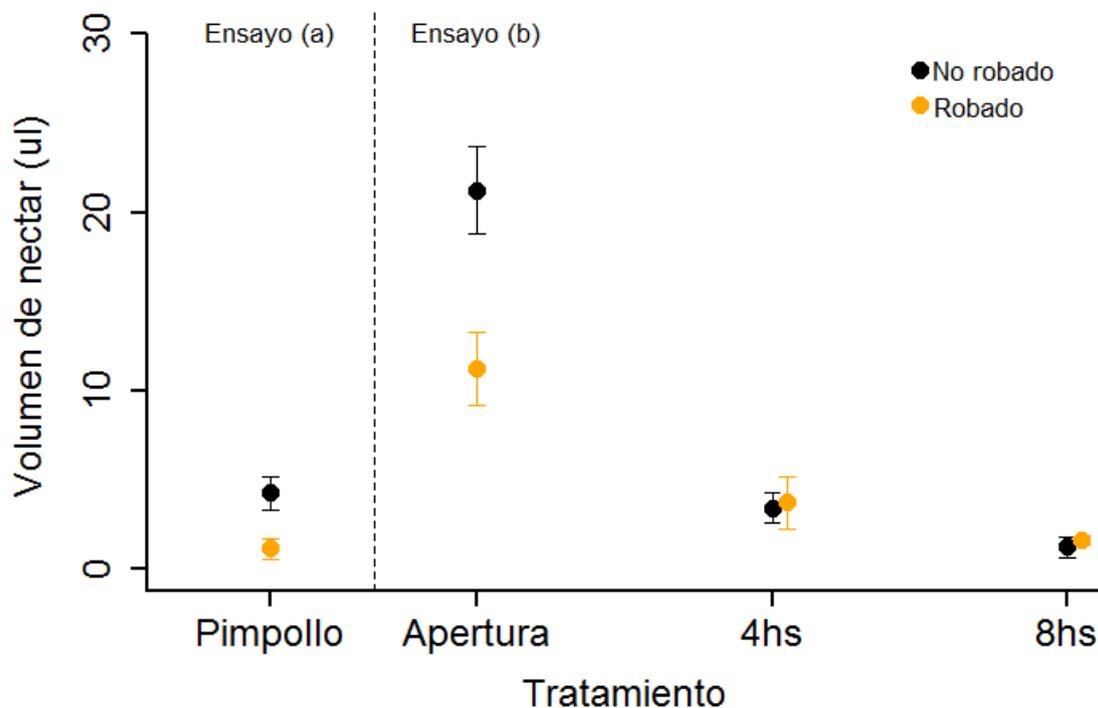


14
 15 Los experimentos de consumo de néctar por el primer robador mostraron que la
 16 cantidad de néctar disponible decrece de (promedio $\pm SE$) $4.25 \pm 0.85 \mu\text{l}$ en pimpollos
 17 antes del robo a $1.13 \pm 0.51 \mu\text{l}$ luego del primer robo (en escala $\ln, \beta= 0.80, SE = 0.26, t$
 18 $= 3.01, P= 0.004$), mostrando que, en promedio, el primer robo remueve $3.12 \mu\text{l}$ de
 19 néctar por pimpollo (Fig. 3, ensayo “a”). Interesantemente, el néctar acumulado al
 20 momento de apertura de la flor decreció de (promedio $\pm SE$) $21.24 \pm 1.24 \mu\text{l}$ cuando los

1 pimpollos no fueron robados a $11.22 \pm 1.02 \mu\text{l}$ en flores cuyos pimpollos fueron
2 robados una vez (en escala \ln , $\beta = -0.56$, $SE = 0.26$, $t = -2.11$, $P = 0.04$) (Fig. 3, ensayo
3 “b”). En promedio, las flores provenientes de pimpollos robados una vez ofrecen la
4 mitad de néctar (i.e. $10.01 \mu\text{l}$ menos néctar) que las flores cuyos pimpollos no fueron
5 robados. El néctar producido luego de las primeras 4 hs, y entre las 4 y 8 hs desde el
6 momento de la apertura floral fue mínimo y no fue diferente entre las flores cuyos
7 pimpollos fueron robados o no ($\beta = 0.28$, $SE = 1.45$, $t = 0.19$, $P = 0.84$, y $\beta = 0.39$, $SE =$
8 1.24 , $t = 0.32$, $P = 0.75$, respectivamente) (Fig. 3, ensayo “b”), con ambos
9 experimentando un decrecimiento fuerte en la producción de néctar luego de la anthesis
10 floral.

11 **Figura 3.** Disponibilidad de néctar en pimpollos no robados y néctar remanente luego
12 del primer robo (Ensayo “a”), y disponibilidad de néctar justo después de la anthesis y
13 producción de néctar durante las primeras 4 hs, y entre las 4 y 8 hs luego de la anthesis en
14 flores cuyos pimpollos fueron no robados y robados (Ensayo “b”). Los puntos muestran
15 medias $\pm 2SE$ en volumen de néctar (μl).

16

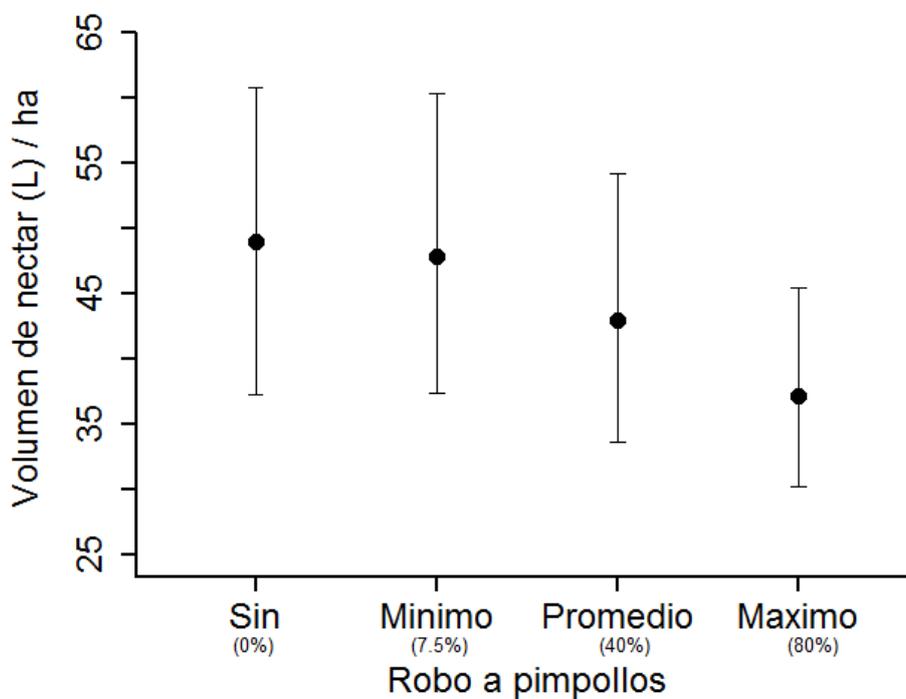


17

18

1 Las estimaciones promedio del “bootstrap” del volumen de néctar disponible
2 para los polinizadores que visitan flores abiertas en campos de frambuesa que no
3 experimentaron robo a pimpollos fue de 48.9 Litros/Ha (Fig. 4). Al tomar en cuenta el
4 mínimo, promedio y valores máximos de robo a pimpollos observados (i.e. 7.5, 40 y 80
5 %) la producción de néctar estimada decreció, en promedio, 2.5% con una producción
6 promedio de 47.8 L/ha, para la intensidad mínima de robo observada, 12%, con un
7 promedio de of 43 L/ha, para el valor promedio de robo observado, y 24%, con una
8 producción promedio de 37.2 L/ha, para los mayores niveles de robo observados (Fig.
9 4).

10
11 **Figura 4.** Estimaciones de “bootstrap” de la producción de néctar (en litros) por
12 hectárea de frambuesa esperados bajo diferentes niveles de robo a pimpollos. Los
13 puntos indican valores promedio de producción de néctar, mientras que las barras
14 indican los cuantiles 2.5 y 97.5 % en plantaciones sin daño y aquellos esperados bajo
15 los valores mínimo, promedio y máximo de robo a pimpollos observados en los campos
16 de frambuesa estudiados del NO Patagónico.



18
19
20

1 **Discusión**

2 La perforación de pimpollos por el abejorro invasor para robar néctar es un
3 fenómeno común observado en los campos de frambuesa del Noroeste Patagónico. Este
4 comportamiento inusual de robo posiblemente sea el resultado de la baja disponibilidad
5 de néctar en flores abiertas, debido a la altísima frecuencia de visita que estas reciben
6 (en promedio $1.5 \text{ visitas} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot 5 \text{ min}^{-1}$, ver Sáez et al. 2014 y Capítulo 2). De hecho,
7 aquí mostré que la intensidad del robo a pimpollos se incrementa con la abundancia del
8 abejorro invasor *B. terrestris* que forrajean en los campos de frambuesa. Más aún,
9 durante más de 25 hs de observación solo ví a los abejorros robando pimpollos,
10 permitiéndoles alcanzar mayores cantidades de néctar por visita en comparación con las
11 abejas mieleras (los abejorros también visitan los pimpollos robados más
12 frecuentemente). Sin embargo, el proceso de robo de pimpollos genera una
13 retroalimentación negativa, reduciendo la disponibilidad de néctar al momento de la
14 apertura floral en flores cuyos pimpollos fueron robados a casi la mitad. De hecho, en
15 los campos con los niveles más altos de robo a pimpollos (80%), estimamos que la
16 disponibilidad de néctar por hectárea de frambuesa decrece, en promedio, un 25%
17 durante el período de floración, en comparación con la disponibilidad esperada sin robo
18 a pimpollos. Es más, estos valores pueden considerarse subestimaciones que reflejan el
19 escenario más optimista dado que las mismas no consideran los impactos del robo
20 secundario los cuales deberían exacerbar estas diferencias.

21 El comportamiento de robo de néctar a través de perforaciones en la corola de
22 las flores ha sido ampliamente descrito para muchas especies de abejas, así como sus
23 consecuencias en diferentes características de las plantas (Maloof y Inouye 200, y
24 referencias allí), pero, ¿por qué roban las abejas? A primera vista, el comportamiento
25 de robo podría ser la única manera para algunas especies de abejas para acceder a los
26 recursos florales, debido a restricciones morfológicas de los visitantes (e.g. una lengua
27 corta) como para acceder al néctar legítimamente (Inouye 1980; Inouye 1983, Garibaldi
28 et al. 2015). Cuando hay diferentes especies de plantas floreciendo simultáneamente, el
29 comportamiento de robo a la flor podría estar también favorecido cuando el balance
30 costo-beneficio entre el tiempo de manipulación (e.g. agujerear una flor es
31 energéticamente más costoso que visitarla legítimamente) y la cantidad de recursos
32 adquiridos por visita lo favorece (ver Irwin et al. 2010). A su vez, Pyke (1982) propuso
33 que las abejas podrían optar por este comportamiento de robo como una estrategia de

1 asegurarse recursos debido a competencia con otras abejas por néctar; sin embargo, esta
2 hipótesis nunca ha sido experimentalmente puesta a prueba (Irwin et al. 2010). Aquí
3 presento evidencias que sostienen la hipótesis de Pyke (1982), mostrando que a medida
4 que se incrementa la abundancia de abejorros en el cultivo se incrementa el
5 comportamiento de robo a pimpollos, sugiriendo que este robo aparece como una
6 consecuencia de competencia por recursos. Consistente con esta hipótesis de
7 competencia por néctar, también observé que cuando la abundancia de *B. terrestris*
8 forrajeando en el cultivo aumenta, la abundancia de las abejas mieleras disminuye.
9 Debido a que este abejorro es capaz de adelantarse en la colecta de néctar a través del
10 robo a los pimpollos, mientras que la abeja no, es de esperar que el abejorro sea quien
11 desplaza a la abeja y no viceversa.

12 Aunque las abejas mieleras son buenas competidoras de recursos de alta calidad
13 debido a su comportamiento cooperativo (Patton 1990, 1996; Wills et al. 1990;
14 Horskins & Turner 1999), en los campos de frambuesa del Noroeste Patagónico los
15 abejorros están obteniendo mayor cantidad de recursos a través de su comportamiento
16 de robo. Este comportamiento que implica una usurpación de recursos florales podría
17 parcialmente explicar por qué el abejorro exótico *B. terrestris* es un invasor tan exitoso
18 en nuestra región. Pero más importante es que a través de competencia directa e
19 indirectamente, a través de la reducción en la producción de néctar causado por la
20 perforación de los pimpollos, la invasión de este abejorro está reduciendo la cantidad de
21 néctar que podría estar siendo aprovechado por las abejas mieleras y,
22 consecuentemente, por lo apicultores en este agroecosistema. Aunque en el Noroeste
23 Patagónico las flores de frambuesa son una fuente importante de néctar para las abejas
24 mieleras, particularmente durante el verano avanzado, ellas también forrajean en
25 muchas especies de plantas nativas y exóticas (Morales C. sin publicar).
26 Desafortunadamente, el abejorro exótico es también un robador frecuente de muchas de
27 estas especies (Morales et al. 2013; Graham 2015). Por esta razón, un estudio que
28 evalúe las consecuencias del robo de néctar a nivel de comunidad podría generar un
29 conocimiento más detallado sobre la partición de recursos producida a partir de la
30 introducción de este abejorro.

31 La introducción de especies manejadas para suplementar el servicio de
32 polinización a cultivos provisto por abejas nativas y silvestres es una práctica común
33 aplicada mundialmente (Velthuis & van Doorn 2006, y referencias allí). Aunque la

1 introducción de polinizadores ha incrementado la producción de muchos cultivos
2 dependientes de polinizadores (Velthuis & van Doorn 2006; Southwick & Southwick
3 1992), en muchas regiones donde estas especies se han vuelto invasoras el costo de su
4 introducción para los ecosistemas naturales y agrícolas posiblemente haya excedido los
5 beneficios (Aizen et al. 2014). Por esta razón, antes de introducir especies exóticas para
6 la polinización de cultivos, prácticas de manejo amigables que incrementen la
7 abundancia y diversidad de polinizadores nativos necesitan ser favorecidas (Carvalho
8 et al. 2011 and 2012; Garibaldi et al. 2013, 2014).

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 **Material Suplementario del Capítulo 4 (C4).**

2

3 **Apéndice C4-1.** Volumen de néctar como estimador de la disponibilidad de

4 recursos.....103

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **Apéndice C4-1.** Volumen de néctar como estimador de la disponibilidad de recursos

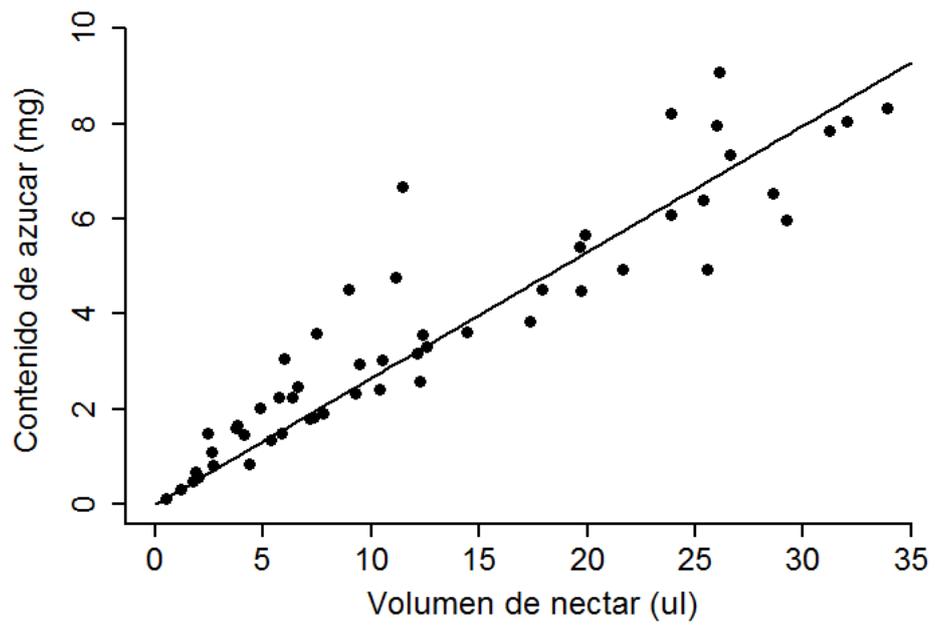
2 El néctar floral consiste en una solución de agua y azúcares, principalmente
3 sacarosa, glucosa y fructosa. Los consumidores de néctar toman la energía de los
4 azúcares, aunque el néctar como fuente de agua también puede ser importante para los
5 nectarívoros (Willmer, 1986; Lotz and Nicolson, 1999). La cantidad de azúcar en el
6 néctar (e.g. miligramos de soluto por microlitro) de una flor es estimado de su volumen
7 total y la concentración de azúcares (Kearns & Inouye 1993). Mientras que la
8 cuantificación del volumen de néctar en flores es relativamente fácil (e.g. usando tubos
9 microcapilares calibrados), la cuantificación de la cantidad de azúcares (e.g. a través del
10 uso de refractómetro) presenta algunos problemas metodológicos, principalmente
11 debido a que la mayoría de los refractómetros necesitan muestras con un mínimo de
12 volumen para poder llevar a cabo la estimación. Algunas flores ofrecen mínimos
13 volúmenes de nectar (< 0.1 mm) impidiendo la correcta cuantificación de azúcares.

14 Aquí estimé la cantidad de azúcar contenida en el néctar mediante una
15 combinación de volumen de néctar y concentración de azúcar (en unidades de sacarosa
16 equivalentes) en una muestra de ~50 flores y pimpollos de frambuesa (ver Kearns y
17 Inouye 1993). Exploré si la variación en la cantidad de azúcar en las flores y pimpollos
18 de frambuesa estaba más afectado por la variación en volumen o concentración de
19 azúcar observada usando análisis de regresión lineal múltiple. Aunque tanto el volumen
20 como la concentración de azúcar mostraron una relación significativa con la cantidad
21 total de azúcar ($\beta_1 = 0.23$, $SE = 0.009$, $P < 0.001$, and $\beta_2 = 0.02$, $SE = 0.005$, $P < 0.001$,
22 respectivamente), el volumen de néctar explicó el 95.1% de la varianza total (ver
23 Figura), mientras que la concentración de azúcar solo el 1.6%. Por lo tanto, se puede
24 concluir que el volumen de néctar es un buen estimador de la cantidad de recursos
25 disponibles en frambuesa.

26 La figura de abajo muestra la relación entre la cantidad de azúcar total (en
27 miligramos) y el volumen de néctar. Los puntos representan muestras de flores o
28 pimpollos, mientras que la línea negra la curva ajustada con parámetros (media \pm SE) a
29 fijado en cero, y $b = 0.23 \pm 0.009$.

30

31



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14

Capítulo 5

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22

Conclusión general

1 Las invasiones biológicas son uno de los principales disturbios de origen
2 antrópico que contribuyen al cambio global, pudiendo afectar negativamente tanto el
3 funcionamiento de los ecosistemas como las interacciones que lo forman (Didham et
4 al.2005; Traveset y Richardson 2006; Crowl et al. 2008). Particularmente, las
5 interacciones entre plantas y polinizadores pueden verse perturbadas por la llegada de
6 un nuevo compañero de interacción. Los impactos de la polinizadores exóticos,
7 originalmente introducidos para la polinización de cultivos, en los ecosistemas naturales
8 han sido previamente estudiados (ver Traveset y Richardson 2006 y referencias allí).
9 Sin embargo, los efectos sobre los sistemas agrícolas como apícolas han permanecido
10 poco explorado. A lo largo de estas tesis me focalicé justamente en el entendimiento de
11 los efectos directos e indirectos de la invasión de polinizadores sobre la calidad de
12 servicio de polinización brindado a cultivos y sus efectos sobre la disponibilidad de uno
13 de los principales recursos para las abejas mieleras manejadas, el néctar. Para entender
14 estos efectos, propuse un marco conceptual donde se describe a la relación planta-
15 polinizador como una relación costo-beneficio. Desde el punto de vista de las plantas,
16 el beneficio es claramente la producción de frutos y semillas, mientras que el costo
17 puede estar constituido por varios factores asociados con la visita de un polinizador
18 como lo son el daño floral o el robo de néctar. De acuerdo a este marco conceptual, el
19 beneficio se satura con el número de visitas, mientras el costo se incrementa con las
20 mismas. Por esta razón, el beneficio neto (i.e. beneficio-costo) se maximiza a un nivel
21 intermedio de visitas, mientras que cuando el costo supera el beneficio la naturaleza
22 mutualista de la interacción se torna antagonista.

23 Utilizando como caso de estudio el abejorro invasor *Bombus terrestris* y el
24 cultivo de mayor relevancia tanto económica como en área cultivada de Patagonia
25 Norte, la frambuesa (*Rubus idaeus*), pude observar que las altas densidades alcanzadas
26 por este abejorro están impactando negativamente tanto la producción de frutos de
27 frambuesa como la disponibilidad de recursos florales que podrían ser utilizados por las
28 abejas mieleras. En principio tener una alta abundancia de polinizadores,
29 independientemente de que sea exóticos o no, debería ser favorable para los cultivos
30 dependientes de polinizadores. Si tomamos en cuenta las masivas floraciones que
31 caracterizan a la mayoría de los cultivos, a priori uno pensaría que cuanto mayor es la
32 oferta de polinizadores mejor será la polinización y producción de fruto o semillas. Esta
33 predicción se basa en un extenso cuerpo de conocimientos que muestra la generalidad

1 de un aumento en el rendimiento en respuesta a aumentos en las abundancias de
2 polinizadores (ver Garibaldi et al. 2013 y referencias allí). No obstante, esta relación ha
3 sido empíricamente probada en un rango de abundancias de polinizadores en el cual los
4 beneficios de la interacción, desde el punto de vista de las plantas, excede a los costos
5 (ver en Capítulo 1, Fig. 2). Sin embargo, aquí he demostrado por primera vez en forma
6 empírica, y en un sistema real, la naturaleza denso-dependiente de dicha relación. En
7 las abundancias reales observadas a campo, el efecto neto del abejorro invasor en la
8 calidad del servicio de polinización brindado a los cultivos de frambuesa varió de
9 positivo a negativo, lo que está de acuerdo con el marco conceptual propuesto. A bajas
10 densidades (baja frecuencia de visita a flores), los beneficios de su visita a las flores de
11 frambuesa (deposición de polen) son mayores a los costos (daño floral) por lo que su
12 presencia incrementa la calidad de frutos. Conforme su densidad en los cultivos
13 aumenta, y por lo tanto su frecuencia de visita a las flores, los costos asociados con el
14 daño a los estilos son mayores a los beneficios de polinización, dando como resultado
15 frutos de menor calidad. Desafortunadamente, uno de los mayores inconvenientes con
16 las especies invasoras es que alcanzan densidades poblacionales extremadamente altas,
17 con abundancias que no son observadas en sus regiones nativas (Goulson 2003;
18 Madjidian et al. 2008; Nagamitsu et al. 2009; Morales et al. 2013), motivo por el cual
19 los polinizadores invasores suelen mostrar frecuencias de visitas a las flores
20 significativamente más altas que lo normal (Morales et al., en prensa). El resultado es
21 que uno esperaría obtener mayores costos que beneficios para los cultivos, como aquí he
22 observado con el caso de *B. terrestris* y las frambuesas del NO Patagónico (Saez et al.
23 2014, Capítulo 2 de esta Tesis).

24 Ahora que sabemos que el abejorro invasor *B. terrestris* está de hecho
25 impactando negativamente sobre la producción y calidad de frutos en los cultivos de
26 frambuesa de nuestra región, debido a su alta frecuencia de visita a las flores, se plantea
27 la necesidad de, o bien erradicar a esta especie exótica, o la menos disminuir sus
28 densidades en los cultivos. Lamentablemente, planes de control o erradicación de
29 polinizadores invasores nunca se han llevado a cabo en ninguna parte del mundo. El
30 único intento de control biológico de polinizadores invasores fue llevado a cabo en
31 Japón por Nagamitsu et al. 2010. Allí, cientos de personas se involucraron en eliminar
32 reinas del abejorro invasor *B. terrestris* durante dos años. Aunque la densidad de este
33 abejorro disminuyó durante un corto tiempo, las poblaciones se recuperaron

1 posteriormente, sugiriendo que no es una solución viable. La ausencia de
2 conocimientos biológicos claves como cuáles son los factores que regulan la demografía
3 de estas especies, atentan contra el éxito de este tipo de medidas.

4 A su vez, cerrar las importaciones de este abejorro en el país vecino (Chile) es
5 otro de los factores a tener en cuenta. Actualmente, cada año Chile importa entre 50 y
6 200 mil colmenas de *B. terrestris* para polinizar cultivos (Aizen M.A., en preparación).
7 Por más medidas que se tomen Argentina para intentar controlar las densidades
8 poblacionales de este abejorro, si cada año cientos de miles de colonias ingresan
9 nuevamente a Chile, tanto el trabajo como la inversión económica empleados en el
10 control de esta especie serían totalmente en vano.

11 Una alternativa a la erradicación es disminuir localmente la densidad de
12 abejorros que visitan el cultivo. Una posible forma de lograr este objetivo, podría ser
13 ofreciendo recursos florales más atractivos que los ofrecidos por la frambuesa en los
14 alrededores de la plantación. Debido a que los polinizadores seleccionan las especies de
15 plantas sobre las cuales forrajear según la cantidad y calidad de recompensa ofrecida,
16 así como por sus rasgos florales (Harder 1990; Galen 1989), el ofrecimiento de recursos
17 más atractivos para los abejorros podría disminuir su densidad dentro del cultivo
18 (Leonhardt y Blüthgen 2012). A pesar que esta propuesta podría brindar una solución a
19 corto plazo y a la escala del cultivo, la oferta de recursos de mayor calidad podría
20 incluso beneficiar las poblaciones de este abejorro introducido, incrementándose los
21 problemas a largo plazo.

22 Por otro lado, la calidad del servicio de polinización brindado por las abejas
23 mieleras manejadas (*A. mellifera*) al cultivo de frambuesa mostró la misma respuesta
24 denso dependiente que la del abejorro invasor *B. terrestris*. Sin embargo, pudimos
25 observar que la tasa de daño de este polinizador es menor a la del abejorro. Aunque en
26 la mayoría de las plantaciones hemos observado densidades mayores al óptimo
27 estimado por nuestro modelo, en ningún caso las densidades de abejas generaron
28 pérdidas mayores al nivel de autopolinización, por lo que su presencia, aunque excesiva,
29 sigue incrementando la producción de la frambuesa. A diferencia del abejorro invasor,
30 aumentar o disminuir la densidad de abejas mieleras en los cultivos de frambuesa
31 debería ser relativamente fácil de llevar a cabo, dado que el productor podría sumar o
32 quitar colmenas próximas a su cultivo, según la necesidad del mismo.

1 El modelo estocástico de polinización para frambuesa nos permitió estimar la
2 frecuencia de visitas que maximiza la producción y calidad de frutos en frambuesa tanto
3 para el abejorro invasor como para la abeja melífera manejada. Como hemos discutido
4 anteriormente, el manejo de la densidad del abejorro exótico en el cultivo es un gran
5 desafío. Sin embargo, el manejo de la densidad de abejas para maximizar el
6 rendimiento es posible. El próximo paso sería relacionar frecuencia de visita con la
7 cantidad de colmenas por unidad de superficie cultivada, para determinar la densidad de
8 colmenas por hectárea que da como resultado la frecuencia de visita promedio óptima
9 estimada.

10 Al día de hoy, el manejo de abejas para brindar servicios de polinización en
11 cultivos asume beneficios que crecen linealmente con la abundancia de polinizadores
12 (Steffan-Dewenter2003; Garibaldi et al. 2013). Sin embargo, aquí observamos una
13 respuesta denso-dependiente no lineal entre la abundancia tanto de abejas como de
14 abejorros sobre la calidad del servicio de polinización brindado hacia el cultivo de
15 frambuesa, lo que abre una nueva forma de entender las interacciones entre
16 polinizadores y plantas. Aunque estos resultados no deberían sorprendernos, ya que
17 respuestas denso-dependientes entre polinizadores y plantas han sido documentadas
18 (Morris et al. 2010, y referencias allí), esta es la primera vez que este tipo de respuesta
19 es observada en un cultivo y en presencia de una especie introducida originalmente con
20 la finalidad de polinizar cultivos y maximizar sus rendimientos. Por este motivo, para
21 realizar planes de manejo de polinizadores exitosos en los agroecosistemas deberíamos
22 no sólo contar con la información sobre los niveles de dependencia a polinizadores, sino
23 también sobre los procesos de polinización y post-polinización involucrados en la
24 producción de frutos y/ semillas.

25 Además de los efectos negativos que el abejorro exótico está generando sobre la
26 producción y calidad de frutos en frambuesa, también observamos que *B. terrestris*
27 podría estar afectando la productividad del sector apícola, al competir por los recursos
28 florales con la abeja manejada *Apis mellifera*. A lo largo de los tres años de muestreos
29 observamos que la abeja melífera y el abejorro invasor realizan, conjuntamente, el 98%
30 del total de las visitas a las flores del cultivo de frambuesa, de los cuales el 53% de esas
31 visitas corresponden a *Apis mellifera* y 47% a *Bombus terrestris*. Aunque no sabemos
32 cuál de estos dos polinizadores es más eficiente captando recursos por visita, ambos
33 están obteniendo recursos de la misma especie. De hecho, observamos que las

1 abundancias de estas dos especies están negativamente relacionadas, lo que podría
2 indicar que están compitiendo por los recursos. Independientemente de cuál de los dos
3 polinizadores sea más eficiente captando recursos por visita, el abejorro mostró una
4 ventaja competitiva por sobre la abeja mielera al adelantarse en la obtención del néctar
5 mediante el robo a pimpollos. Aunque el robo de néctar es un comportamiento habitual
6 en ciertas especies de abejas de gran tamaño, el robo de néctar a pimpollos nunca había
7 sido descrito en la literatura. Este comportamiento de robo a pimpollos fue
8 frecuentemente observado en los campos de frambuesa, reduciendo la cantidad de
9 néctar producido por las flores.

10 Como hemos dicho, los cultivos de frambuesa del NO Patagónico son visitados
11 casi exclusivamente por dos especies de polinizadores (abejas mieleras y abejorro
12 invasor). Más allá de los efectos denso-dependientes aquí mostrados, la presencia de
13 ensambles diversos de polinizadores, con distintas morfologías corporales y
14 comportamiento de forrajeo, son necesarios para asegurar altos rendimientos en cultivos
15 dependientes de polinizadores (Graibaldi et al. 2013; Garibaldi et al. 2015). Aunque
16 aquí no hemos explorado aun si la falta de diversidad de polinizadores silvestres se debe
17 a las altas densidad del abejorro invasor *B. terrestris* y las abejas mieleras *A. mellifera* a
18 través de desplazamiento competitivo, nuestra base de datos será analizada
19 próximamente para responder este interrogante.

20 A lo largo de esta tesis pudimos ver que la invasión del abejorro *B. terrestris*,
21 originalmente introducido para brindar servicios de polinización en un país vecino, está
22 impactando negativamente tanto la calidad de la producción del cultivo de mayor
23 relevancia en Patagonia Norte, como la disponibilidad de recursos para las abejas
24 mileras manejadas. Además de los efectos negativos aquí descriptos sobre los
25 agroecosistemas, esta especie invasora también ha impactado negativamente tanto sobre
26 la fauna como la flora nativa de la región (Arbetman et al. 2013; Morales et al. 2013;
27 Graham 2015). Por estos motivos, creemos que la introducción de especies para brindar
28 servicios de polinización a cultivos no representa una solución a la problemática de
29 servicios de polinización al largo plazo. De hecho, los costos de su introducción
30 podrían llegar a ser mayores a sus beneficios. Numerosas formas de manejo
31 ambientalmente amigables y eficientes como bordes naturales rodeando las
32 plantaciones, incrementar la heterogeneidad en los agroecosistemas, reducir el uso de
33 insecticidas, etc, han sido descriptas para la polinización de cultivos sin la necesidad de

1 introducir especies exóticas (Carvalho et al. 2011 y 2012; Garibaldi et al. 2014). Por
2 estos motivos, aquí alentamos fuertemente a utilizar estas prácticas de manejo en vez de
3 la introducción de especies.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

1 **Agradecimientos**

2 Quiero agradecer especialmente a Marcelo A. Aizen, Carolina L. Morales, Lucas A.
3 Garibaldi, Juan M. Morales y Lawrence Harder no solo por haberme enseñado a hacer
4 ciencia, sino también por haber compartido tantos buenos momentos extra-laborales.

5 También hay muchas, muchas personas que han aportado mucho en mi crecimiento
6 profesional y con quienes he compartido muchas alegrías: Agustina S.dV., Florencia T.,
7 Sergio L., Guillermo A., Marina A., Martin N., Carolina Q., Juan P., Gabriela G.,
8 Vanina C., Marina S., Pablo A., Anahi F., Jennifer L. los investigadores y becarios de
9 Ecotono y muchas personas increíbles de la Universidad del Comahue.

10 A CONICET, al programa BEC.AR – Comisión Argentina Fulbright, a los PICT 2013-
11 01300, PICT 2007-01464 y PICT 2012-3015 por el financiamiento durante estos años.

12 Y los productores, gracias por abrir las puertas de sus casas. Especialmente a Miguel
13 Molina y Emilio de “Arroyo Claro” por todo el apoyo y buena onda.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **Bibliografía**

2 Abe T., Wada K., Kato Y., Makino S., Okochi I. (2011). Alien pollinator promotes
3 invasive mutualism in an insular pollination system. *Biological Invasions*, 13:
4 957-967.

5
6 Aizen M.A, Feinsinger P. (1994). Habitat fragmentation, native insect pollinators,
7 and feral honey bees in Argentine Chaco Serrano. *Ecological Applications*, 4:
8 378-392.

9
10 Aizen M.A., Garibaldi L.A., Cunningham S.A., Klein A.M. (2008) Long-term global
11 trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing
12 pollinator dependency. *Current Biology*, 18: 1572-1575.

13
14 Aizen M.A., Harder L.D. (2007). Expanding the limits of the pollen-limitation
15 concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, 88: 271-281.

16
17 Aizen M.A., Harder L.D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is
18 growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, 19: 915-918.

19
20 Aizen M.A., Morales C.L., Morales J.M. (2008). Invasive mutualists erode native
21 pollination webs. *PLoS Biology*, 6: e31.

22
23 Aizen M.A., Morales C.L., Vázquez D.P., Garibaldi L.A., Sáez A., Harder L.D. (2014).
24 When mutualism goes bad: density-dependent impacts of introduced bees on plant
25 reproduction. *New Phytologist*, 204: 332-328.

26
27 Aizen M.A., Vázquez D.P. (2006). Flowering phenologies of hummingbird plants from
28 the temperate forest of southern South America: is there evidence of competitive
29 displacement? *Ecography*, 29: 357-366.

30
31 Alexander M.P. (1980). A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Biotechnic*
32 *& Histochemistry*, 55: 13-18.

33

1 Antonovics J. (2005). Plant venereal diseases: insights from a messy metaphor. *New*
2 *Phytologist*, 165: 71-80.

3 Ashman T-L, Baker I. (1992). Variation in floral sex allocation with time of season
4 and currency. *Ecology*, 73: 1237-1243.

5

6 Ashman T.L., Knight T.M., Steets, J.A., Amarasekare P., Burd, M., Campbell D.R.,
7 Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J. (2004). Pollen limitation of
8 plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85:
9 2408-2421.

10

11 Badano E.I., Vergara C.H. (2011). Potential negative effects of exotic honey bees on the
12 diversity of native pollinators and yield of highland coffee plantations. *Agricultural and*
13 *Forest Entomology*, 13: 365-372.

14

15 Bates D., Maechler M., Nolkner B., Walker S. (2015). *lme4: Linear mixed-effects models*
16 *using Eigen and S4*. R package version 1.1-8, <http://CRAN.Rproject.org/package=lme4>.

17

18 Benjamin F.E., Winfree R. (2014). Lack of Pollinators Limits Fruit Production in
19 Commercial Blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *Environmental Entomology*, 43:
20 1574-1583.

21

22 Bascompte J., Jordano P. (2014). Mutualistic networks. Princeton, NJ, USA: Princeton
23 University Press.

24

25 Benton TG, Vickery J A, Wilson JD (2003). Farmland biodiversity: is habitat
26 heterogeneity the key? *Trends in Ecology and Evolution*, 18:182-188.

27

28 Bolker B.M. (2008). *Ecological models and data in R*. Princeton University Press.

29

30 Bolker B (2012). Tools for general maximum likelihood estimation. CRAN R Project.

31

32 Bolker B.M., Fournier D., Skaug, H., Magnusson A., Nielsen, A. (2012). Generalized
33 Linear Mixed Models using AD Model Builder. R package version 0.7.7.

34

- 1 Bommarco R., Lundin O., Smith H.G., Rundlöf M. (2012). Drastic historic shifts in
2 bumble-bee community composition in Sweden. *Proceedings of the Royal Society B*,
3 279: 309-315.
- 4
- 5 Bronstein JL. (2001). The costs of mutualism. *American Zoologist*, 41: 825-839.
- 6
- 7 Buteler M., Stadler T., Lopez Garcia G.P., Lassa M.S., Trombotto Liaudat D., D'adamo
8 P., Valeria F.A. (2011). Insecticidal propeties of ashes from the volcanic complex
9 Puyehue-Caulle Range and their possible environmental impact. *Revista de la Sociedad*
10 *Entomológica Argentina*, 70: 149-156.
- 11
- 12 Cabrera A.L. (1976). Territorios fitogeográficos de la República Argentina.
13 Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Ed. Acme SACI: Buenos Aires.
- 14
- 15 Cane J.H. (2005). Pollination potential of the bee *Osmia aglaia* for cultivated red
16 raspberries and blackberries (Rubus: Rosaceae). *HortScience*, 40: 1705-1708.
- 17
- 18 Carvalheiro L.G., Veldtman R., Shenkute A.G., Tesfa, G.B., Pirk C.W.W., Donaldson
19 J.S. & Nicolson S.W. (2011). Natural and within-farmland biodiversity enhances crop
20 productivity. *Ecology Letters*, 14: 251-259.
- 21
- 22 Carvalheiro L.G., Seymour C.L., Nicolson S.W., Veldtman R. (2012). Creating patches
23 of native flowers facilitates crop pollination in large agricultural fields: mango as a case
24 study. *Journal of Applied Ecology*, 49: 1373-1383.
- 25
- 26 Castro S., Silveira P., Navarro L. (2008). Consequences of nectar robbing from the
27 fitness of a threatened plant species. *Pant Ecology*, 199: 201-208.
- 28
- 29 Chagnon M., Gingras J., Oliveira D.D. (1991). Honey bee (Hymenoptera: Apidae)
30 foraging behavior and raspberry pollination. *Journal of Economic Entomology*, 84:
31 457-460.
- 32
- 33 Combs JK. (2011). Predispersal seed predators and nectar robbers: the influence of
34 plant and animal traits on plant reproduction and bumblebee foraging behavior. PhD

1 thesis, University of Washington, Seattle, WA, USA.
2
3 Cunningham S.A. (1995). Ecological constraints on fruit initiation by *Calypstrogyne*
4 *ghiesbreghtiana* (Arecaceae): floral herbivory, pollen availability, and visitation by
5 pollinating bats. *American Journal of Botany*, 82: 1527-1536.
6
7 Crane E., Walker P. (1984). *Pollination directory for world crops*. International Bee
8 Research Association. 183 pp.
9
10 Crawley M.J. (2007). *The R Book*. Wiley.
11
12 Cruzan M.B. (1986). Pollen tube distributions in *Nicotiana glauca*: evidence for density
13 dependent growth. *American Journal of Botany*, 73: 902-907.
14
15 Dafni A., Kevan P., Gross C.L., Goka K. (2010). *Bombus terrestris*, pollinator, invasive
16 and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for
17 commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45: 101-113.
18
19 Dedej S., y Delaplane K.S. (2005). Net energetic advance drives honey bees (*Apis*
20 *mellifera* L) to nectar larceny in *Vaccinium ashei* Reade. *Behavioral Ecology and*
21 *Sociobiology*, 57: 398-403.
22
23 Delaplane K.S., Mayer D.F. (2000). *Crop pollination by bees*. CABI Publishing, Oxon,
24 United Kingdom.
25
26 Dewenter I.S.T. (2003). Original article Seed set of male-sterile and male-fertile oilseed
27 rape (*Brassica napus*) in relation to pollinator density. *Apidologie*, 34: 227-235.
28
29 Dohzono, I., Kunitake Y.K., Yokoyama J. y Goka K. (2008). Alien bumble bee affects
30 native plant reproduction through interactions with native bumble bees. *Ecology*, 89:
31 3082-3092.
32
33 Dohzono I., Yokoyama J. (2010). Impacts of alien bees on native plant–pollinator
34 relationships: a review with special emphasis on plant reproduction. *Applied*

1 *Entomology and Zoology*, 45: 37-47.

2

3 Fernandez-Arhex V., Buteler M., Amadio M.E., Enriquez A., Pietrantuono A.L., Stadler
4 T., Becker G., Bruzone O. (2013). The effect of volcanic ash from Puyehue Caille
5 range eruption on the survival of *Dichroplus vittigerum* (Orthoptera: Acrididae).
6 *Florida Entomologist*, 96: 286-288.

7

8 Gaitan J.J., Ayesa J.A., Umaña F., Raffo F. & Bran D.B. (2011). Cartografía del área
9 afectada por cenizas volcánicas en las provincias de Río Negro y Neuquén. pp. 8.
10 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuria (INTA), Estación experimental S.C. de
11 Bariloche.

12

13 Garibaldi L.A., Aizen M.A., Klein A.M., Cunningham S.A., Harder L.D. (2011). Global
14 growth and stability of agricultural yield decrease with pollinator dependency.
15 *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 14:
16 5909-5914.

17

18 Garibaldi L.A., Bartomeus I., Bommarco R., Klein A.K., Cunningham S.A., et al.
19 (2015). Trait matching of flower visitors and crops predict fruit set better than trait
20 diversity. *Journal of Applied Ecology*, 52: 1436-1444.

21

22 Garibaldi L.A., Carvalheiro L.G., Leonhardt S.D., Aizen M.A., Blaauw B.R., et al.
23 (2014). From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators.
24 *Frontiers in Ecology and Evolution*, 12: 439-447.

25

26 Garibaldi L.A., Steffan-Dewenter I., Kremen C., Morales J.M., Bommarco R.,
27 Cunningham S.A., et al. (2011). Stability of pollination services decreases with isolation
28 from natural areas despite honey bee visits. *Ecology Letters*, 14: 1062-1072.

29 Garibaldi L.A., Steffan-Dewenter I., Winfree R., Aizen M.A., Bommarco R.,
30 Cunningham S.A., Kremen C., Carvalheiro L.G., Harder L.D., Afik O., et al. (2013).
31 Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance.
32 *Science*, 339: 1608-1611.

1 Gelman A. & Hill J. (2007) *Data analysis using regression and multilevel/hierarchical*
2 *models*. Cambridge University Press.
3
4 Geslin B. y Morales C.L. (2015). New records reveal rapid geographic expansion of
5 *Bombus terrestris* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), an invasive species in
6 Argentina. DOI: <http://dx.doi.org/10.15560/11.3.1620>.
7
8 González-Gómez P.L. & Valdivia C.E. (2005) Direct and indirect effects of nectar
9 robbing on the pollinating behavior of *Patagona giga* (Trochilidae). *Biotropica*, 37: 693-
10 396.
11
12 Goulson D. (2003). Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of*
13 *Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 1-26.
14
15 Goulson D., Sparrow K.R. (2009). Evidence for competition between honeybees and
16 bumblebees; effects on bumblebee work size. *Journal of Insect Conservation*, 13: 177-
17 181.
18
19 Graham L.E. (2015). Efecto del robo de néctar por el abejorro invasor *Bombus terrestris*
20 sobre la polinización y éxito reproductivo de la arvejilla nativa *Vicia nigricans*
21 (Fabaceae). Tesina, Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario
22 Bariloche.
23
24 Hair J. F. Jr., Anderson, R. E., Tatham R. L., Black W. C. (1995). *Multivariate Data*
25 *Analysis*, 3rd edn. New York: Macmillan.
26
27 Haragsimova-Neprasova L. (1960). Measurements of nectar secretions in plants. *Ved.*
28 *Pro Vyzk. Ustavu Veelar CSAZ*, 2: 63-69 (in Czechoslovakian). In Chagnon M.,
29 Gringas J., and de Olivera D. (1991). Honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging
30 behavior and raspberry pollination. *Journal of Economic Entomology*, 84: 457-460.
31
32 Harder L.D., Richards S.A., Routley M.B. (2008). Effects of reproductive
33 compensation, gamete discounting and reproductive assurance on mating-system
34 diversity in hermaphrodites. *Evolution*, 62: 157-172.

1
2 Harder L.D., Williams N.M., Jordan C.Y., Nelson W.A. (2001). The effects of floral
3 design and display on pollinator economics and pollen dispersal. In: Chittka L,
4 Thomson JD, eds. *Cognitive ecology of pollination*. Cambridge, UK: Cambridge
5 University Press, 297-317.
6 Harder L.D., Aizen M.A., Richards S.A. (2016). The population ecology of male
7 gametophytes: the link between pollination and seed production.
8
9 Hargreaves A.L., Harder L.D., Johnson S.D. (2009). Consumptive emasculation: the
10 ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biological Reviews*, 84:
11 259-276.
12
13 Herrera C.M. y Pellmyr O. (2009). *Plant-animal interactions, an evolutionary approach*.
14 Oxford, UK.
15
16 Horskins K., Turner V.B. (1999). Resources use and foraging patterns of honeybees,
17 *Apis mellifera*, and native insects on flowers of *Eucalyptus costata*. *Australian Journal*
18 *of Ecology*, 24: 221-227.
19
20 Herrera C.M., García I.M., Pérez R. (2008). Invisible floral larcenies: microbial
21 communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology*, 89:
22 2369-2376.
23
24 Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A. (2005). Very high
25 resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of*
26 *Climatology*, 25: 1965-1978.
27
28 Holden, C. (2006). Report warns of looming pollination crisis in North America.
29 *Science*, 314: 397-397.
30
31 Holland J.N., Deangelis D.L., Schultz S.T. (2004). Evolutionary stability of mutualism:
32 interspecific population regulation as an evolutionarily stable strategy. *Proceedings*
33 *of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271: 1807-1814.
34

1 Holzschuh A., Dormann C.F., Tschardt T., Steffan-Dewenter I. (2011). Expansion
2 of mass-flowering crops leads to transient pollinator dilution and reduced wild
3 plant pollination. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological*
4 *Sciences*, 278: 3444-3451.

5

6 Inouye D.W. (1980). The terminology of floral larceny. *Ecology*, 61:1251-1252.

7

8 Inouye D.W. (1983). The ecology of nectar robbing. Pages 153–173 in B. Bentley and
9 T. Elias, editors. *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York, New
10 York, USA.

11

12 Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2012). Sistema
13 Agroalimentario Localizado de la Comarca Andina del Paralelo 42°. Maidana V.A.
14 Representante del IICA en la Argentina. Buenos Aires, Diciembre del 2012.

15

16 Irwin R.E. (2000). Hummingbird avoidance of nectar-robbled plants: spatial location or
17 visual cues. *Oikos*, 91: 499-506.

18

19 Irwin R.E., Bronstein J.L., Manson J.S. y Richardson L. (2010). Nectar robbing:
20 ecological and evolutionary perspectives. *Annual Review of Ecology, Evolution, and*
21 *Systematics*, 41: 271-292.

22

23 Kaiser-Bunbury C.N., Valentin T., Mougil J., Matatiken D., Ghazoul J. (2011). The
24 tolerance of island plant–pollinator networks to alien plants. *Journal of Ecology*, 99:
25 202-213.

26

27 Keane R.M., Crawley M.J. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release
28 hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 164-170.

29

30 Kearns C.A., Inouye D.W. (1993). *Techniques for Pollination Biologist*. University
31 Press Colorado.

32 Kearns C.A., Inouye D.W., y Waser N.M. (1998). Endangered mutualisms: the
33 conservation of plant–pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and*

1 *Systematics*, 29: 83-112.

2

3 Kenta T., Inari N., Nagamitsu T., Goka K., Hiura T. (2007). Commercialized
4 European bumblebee can cause pollination disturbance: an experiment on seven
5 native plant species in Japan. *Biological Conservation*, 134: 298-309.

6 King C., Ballantyne G., Willmer P.G. (2013). Why flower visitation is a poor proxy for
7 pollination: measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination
8 networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution*, 4: 811-818.

9

10 Klein A.M., Vaissiere B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen
11 C., Tscharntke T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world
12 crops. *Proceedings of the Royal Society B*, 274: 303-313.

13

14 Klinkhamer P.G.L., de Jong T.J. (1993). Attractiveness to pollinators: a plant's
15 dilemma. *Oikos*, 66: 180-183.

16

17 Kremen C., Ricketts T. (2000). Global perspectives on pollination disruptions.
18 *Conservation Biology*, 14: 1226-1228.

19

20 Leonhardt S.D., Blüthgen N. (2012). The same, but different: pollen foraging in
21 honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie*, 43: 449-464.

22

23 Lotz C.N., Nicolson S.W. (1999). Energy and water balance in the lesser double-collared
24 sunbird (*Nectarinia chalybea*) feeding on different nectar concentrations. *Journal of*
25 *Comparative Physiology B*, 169: 200-206.

26 Lye G.C., Jennings S.N., Osborne J.L., Goulson D. (2011). Impacts of the use of non-
27 native commercial bumble bees for pollinator supplementation in raspberry. *Journal of*
28 *Economic Entomology*, 104: 107-114.

29

30 Maloof J.E. e Inouye D.W. (2000). Are nectar robbers cheaters or mutualists? *Ecology*,
31 81: 2651-2661.

32

- 1 Martínez E. (2009). Costos y beneficios del cultivo de frambuesa. *Presencia*, N° 53, 26-
2 29.
- 3
- 4 Martínez A.S., Masciocchi M., Villacide J.M., Huerta G., Danier L., Bruchhausen A.,
5 Rozas G., Corley J.C. (2013). Ashes in the air: the effects of volcanic ash emissions on
6 plant-pollinator relationships and possible consequences for apiculture. *Apidology*, 44:
7 268-277.
- 8
- 9 Matsumura C., Yokoyama J., Washitani I. (2004). Invasion status and potential
10 ecological impacts of an invasive alien bumblebee, *Bombus terrestris* L.
11 (Hymenoptera: Apidae) naturalized in Southern Hokkaido, Japan. *Global*
12 *Environmental Research*, 8: 51-66.
- 13
- 14 Memmott J., Waser N.M. (2002). Integration of alien plants into a native flower–
15 pollinator visitation web. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B:*
16 *Biological Sciences*, 269: 2395-2399.
- 17
- 18 Milivojevic J.M., Nikolic M.D., Dragisic Maksimovic J.J., Radivojevic D.D. (2011).
19 Generative and fruit quality characteristics of primocane fruiting red raspberry
20 cultivars. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 35: 289-296.
- 21
- 22 Morales C.L. (2009). Pollination requirement of raspberry in SW Argentina.
23 Preliminary Results. *The International Journal of Plant Reproductive Biology*, 1: 195-
24 198.
- 25
- 26 Morales C.L., Aizen M.A. (2002). Does invasion of exotic plants promote invasion of
27 exotic flower visitors? A case study from the temperate forests of the southern Andes.
28 *Biological Invasions*, 4: 87-100.
- 29
- 30 Morales C.L., Aizen M.A. (2006). Invasive mutualisms and the structure of plant–
31 pollinator interactions in the temperate forests of north-west Patagonia,
32 Argentina. *Journal of Ecology*, 94: 171-180.
- 33
- 34 Morales C.L., Arbetman M.P., Cameron S.A., Aizen M.A. (2013). Rapid ecological

1 replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the*
2 *Environment*, 11: 529-534.

3

4 Morales C.L., Saez A., Arbetman M.P., Cavallero L., Aizen M.A. (2014). Detrimental
5 effects of volcanic ash deposition on bee fauna and plant–pollinator interactions.
6 *Ecologia Austral*, 24: 42-50.

7

8 Morales C.L., Traveset A. (2009). A meta-analysis of impacts of alien vs. native plants
9 on pollinator visitation and reproductive success of co-flowering native plants.
10 *Ecology Letters*, 12: 716-728.

11

12 Morris W.F., Vázquez D.P., Chacoff N.P. (2010). Benefit and cost curves for typical
13 pollination mutualisms. *Ecology*, 91: 1276-1285.

14

15 Nabhan G.P., Buchmann S.L. (1997). Services provided by pollinators. In, *Nature's*
16 *Services*, Daily G., Island Press, California.

17

18 Neter J., Wasserman W., Kutner M. H. (1989). *Applied Linear Regression Models*.
19 Homewood, IL: Irwin.

20

21 Obeso J.R. (2002). The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155: 321-348.

22

23 Olesen J.M., Eskildsen L.I., Venkatasamy S. (2002). Invasion of pollination networks
24 on oceanic islands: importance of invader complexes and endemic super
25 generalists. *Diversity and Distributions*, 8: 181-192.

26

27 Ollerton J., Watts S. (2012). Pollination ecology of the invasive tree tobacco *Nicotiana*
28 *glauca*: comparisons across native and non-native ranges. *Journal of Pollination*
29 *Ecology*, 9: 85-95.

30

31 Ollerton J., Winfree R., Tarrant S. (2011). How many flowering plants are pollinated
32 by animals? *Oikos*, 120: 321-326.

33

1 Osborne J.L., Martin A.P., Carreck N.L., Swain J.L., Knight M.E., Goulson D., Hale
2 R.J., Sanderson R.A. (2008). Bumblebee flight distances in relation to the forage
3 landscape. *Journal of Animal Ecology*, 77: 406-415.
4
5 Parker I.M. (1997). Pollinator limitation of *Cytisus scoparius* (Scotch broom), an
6 invasive exotic shrub. *Ecology*, 78: 1457-1470.
7 Paton D.C. (1990). Budgets for the use of floral resources in mallee heath. In *The*
8 *Mallee Lands: A Conservation Perspective*, ed. JC Noble, PJ Joss, GK Jones, pp. 189–
9 93. Melbourne: CSIRO
10
11 Paton D.C. (1996). Overview of feral and managed honeybees in Australia: distribution,
12 abundance, extent of interactions with native biota, evidence of impacts and future
13 research. Canberra: Aust. Nat. Conserv. Agency
14
15 Perrings C., Williamson M., Barbier E.B., Delfino D., Dalmazzone S., Shogren J.,
16 Simmons P., Watkinson A. (2002). Biological invasion risk and public good: an
17 economic perspective. *Conservation Biology*, 6:1.
18
19 Pimentel D. (2001). *Biological Invasions. Economic and Environmental Costs of Alien*
20 *Plant, Animal, and Microbe Species*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
21
22 Pimentel D., Zuniga R., Morrison D. (2004). Update on the environmental and
23 economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological*
24 *Economics*, 52: 273-288.
25
26 Pinheiro J.C. y Bates D.M. (2000) *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer.
27
28 Pinheiro J., Bates D., DebRoy S., Sarkar D., R Core Team. 2015. *nlme: Linear and*
29 *Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-121, [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=nlme)
30 [project.org/package=nlme](http://CRAN.R-project.org/package=nlme)
31
32 Piñeiro G., Perelman S., Guerschman J.P., y Paruelo J.M. (2008). How to evaluate
33 models: observed vs. predicted or predicted vs. observed? *Ecological Modelling*, 216:
34 316-322.

1

2 Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C. (2010). Global pollinator declines: trends,
3 impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 345-353.

4

5 Praz C.J., Müller A., Dorn S. (2008). Specialized bees fail to develop on non-host
6 pollen: do plants chemically protect their pollen? *Ecology*, 89: 795-804.

7 Pujol G., Iooss B., Janon A. (2012). Package: Sensitivity. R Project.

8

9 Pyke G. H. (1982). Foraging in bumble bees: rule of departure from an inflorescence.
10 *Canadian Journal of Zoology*, 60: 417-428.

11

12 Pyke G.H. (1991). What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*, 350:
13 58-59.

14

15 R, Development Core Team (2012) R: a language and environment for statistical
16 computing. Version 2.15.1. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

17

18 Ramos L.Y. (2012). Requerimientos de polinización en cultivos de grambuesa (*Rubus*
19 *idaeus*) en la región Norandino-Patagónica. Tesina, Universidad Nacional del Comahue,
20 Centro Regional Universitario Briloche.

21

22 Robinson R.A. y Sutherland W.J. (200). Post-war changes in arable farming and
23 biodiversity in Great Britain. *Journal of Applied Ecology*, 39:157-1176.

24

25 Rojas-Nossa S.V., Sánchez J.M., Navarro L. (2015). Nectar robbing: a common
26 phenomenon mainly determined by accessibility constrains, néctar volume and density
27 of energy rewards. *Oikos*, DOI: 10.1111/oik.02685.

28

29 Roubik D.W., Holbrook N.M., Parra G.V. (1985). Roles of nectar robbers in
30 reproduction of the tropical treelet *Quassia amara* (Simaroubaceae). *Oecologia*, 66:161-
31 167.

32

1 Sáez A., Morales C.L., Ramos L.Y., Aizen M.A. (2014). Extremely frequent bee visits
2 increase pollen deposition but reduce drupelet set in raspberry. *Journal of Applied*
3 *Ecology*, 51:1603-1612.
4

5 Sala O.E., Chapin F.S., Armesto J.J., Below E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald
6 E., Huenneke L.F., et al. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100.
7 *Science*, 287: 1770-1774.
8

9 Saltelli A. (2002). Making best use of model evaluations to compute sensitivity indices.
10 *Computer Physics Communications*, 14: 280-297.

11 Saltelli A., Annoni P, Azzini I, Campolongo F., Ratto M., Tarantola S.
12 (2010). Variance based sensitivity analysis of model output. Design and estimator for
13 the total sensitivity index. *Computer Physics Communications*, 181: 259-270.

14 Sanguinetti A., Bustos-Singer R. (2014). Invasive bees promote high reproductive
15 success in Andean orchids. *Biological Conservation*, 175: 10-20.
16

17 Santos G.M., Aguiar C.M., Genini J., Martins C.F., Zanella F.C., Mello M.A. (2012).
18 Invasive Africanized honeybees change the structure of native pollination
19 networks in Brazil. *Biological Invasions*, 14: 2369-2378.
20

21 Schemske D.W., Fenster C. (1983). Pollen-grain interactions in a neotropical *Costus*:
22 effects of clump size and competitors. *Pollen Biology and Implications for Plant*
23 *Breeding*, 405: 410.
24

25 Schmid-Hempel P., Schmid-Hempel R., Brunner P.C., Seeman O.D., Allen G.R.
26 (2007). Invasion success of the bumble bee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic
27 bottleneck. *Heredity*, 99: 414-422.
28

29 Schmid-Hempel R., Eckhardt M., Goulson D., Heinzmann D., Lnge C., Plischuk S.,
30 Ecuero L.R., Salathé R. (2014). The invasion of southern South America by imported
31 bumble bee and associated parasites. *Journal of Animal Ecology*, 83: 823-837.
32

1 Schulze J., Oeschger L., Gross A., Mueller A., Stoll P., Erhardt A. (2012). Solitary bees
2 – Potential vectors for gene flow from cultivated to wild strawberries. *Flora –*
3 *Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207: 762-767.
4
5 Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) (2006) Frambuesa.
6 Análisis de cadena Alimentaria. Ingeniero Agrónomo Bruzone, I., Buenos Aires,
7 República Argentina.
8
9 Shaanker U.R., Ganeshaiyah K.N., Bawa K.S. (1988). Parent-offspring conflict, sibling
10 rivalry, and brood size patterns in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and*
11 *Systematics*, 19: 177-205.
12
13 Shipley B. (2009). Confirmatory path analysis in a generalized multilevel context.
14 *Ecology*, 90: 363-368.
15
16 Shykoff J.A., Bucheli E., Kaltz O. (1996). Flower lifespan and disease risk. *Nature*,
17 379: 779.
18
19 Simberloff D., Martin J.L., Genovesi P., Maris V., Wardle D.A., Aronson J.,
20 Courchamp F., Galil B., et al. (2013). Impacts of biological invasions: what's what and
21 the way forward. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 28: 58-66.
22
23 Simidchiev T. (1976). Study on the nectar and honey productivity of red raspberry
24 (*Rubus idaeus L.*) and European blackberry (*Rubus fruticosus L.*). *Horticultural and*
25 *Viticultural Science*, 13: 42-49.
26
27 Simms EL, Rausher MD (1987). Costs and benefits of plant resistance to herbivory.
28 *American Naturalist*, 130: 570-581.
29
30 Soberón J., Martínez del Río C. (1985). Cheating and taking advantage in mutualistic
31 associations. Pages 192– 216 in D. Boucher, editor. *The biology of mutualism: ecology*
and evolution. Oxford University Press, New York, New York, USA.

1 Sobol I.M., Tarantola S., Gatelli D., Kucherenko S.S., Mauntz W. (2007). Estimating
2 the approximation errors when fixing unessential factors in global sensitivity analysis.
3 *Reliability Engineering and System Safety*, 92: 957-960.
4

5 Southwick E.E. (1984). Photosynthate allocation to floral nectar: a neglected energy
6 investment. *Ecology*, 65: 1775-1779.
7

8 Southwick E.E., Southwick L.J.R. (1992). Estimating the economic value of honey bees
9 (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinator in the United States. *Journal of*
10 *Economic Entomology*, 85: 621-633.
11

12 StataCorp (1997). Reference Manual A-F (Release 5). College Station, TX: Stata Press.
13 Wood, F. S. (1984). Effect of centering on collinearity and interpretation of the
14 constant. *The American Statistician*, 38: 88-90.
15

16 Steffan-Dewenter I. (2003). Seed set of male-sterile and male-fertile oilseed rape
17 (*Brassica napus*) in relation to pollinator density. *Apidology*, 34: 227-235.
18

19 Steffan-Dewenter I., Kuhn A. (2003). Honey bee foraging in differentially structured
20 landscapes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: 569-575.
21

22 Stephens D.W., Krebs J.R. (1986). Foraging theory. Princeton, NJ, USA: Princeton
23 University Press.
24

25 Stout J.C., Kells A.R., Goulson D. (2002). Pollination of the invasive exotic shrub
26 *Lupinus arboreus* (Fabaceae) by introduced bees in Tasmania. *Biological*
27 *Conservation*, 106: 425-434.
28

29 Stout J.C., Morales C.L. (2009). Ecological impacts of invasive alien species on bees.
30 *Apidologie*, 40: 388-409.
31

32 Tasei J-N., y Aupinel P. (2008). Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes
33 tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera:
34 Apidae). *Apidologie*, 39: 397-409.

1
2 Thomson D. (2004). Competitive interactions between the invasive European honey bee
3 and native bumble bees. *Ecology*, 85: 458-470.
4
5 Torretta J.P., Medan D., Abrahamovich A.H. (2006). First record of the invasive
6 bumble bee *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in Argentina. *Transactions*
7 *of the American Entomological Society*, 132: 285-289.
8
9 Traveset A., Richardson D.M. (2006). Biological invasions as disruptors of plant
10 reproductive mutualisms. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 21: 208-2016.
11
12 Traveset A., Willson M.F., Sabag C. (1998). Effect of nectar-robbing birds on fruit set
13 of *Fuchsia magellanica* in Tierra del Fuego: a disrupted mutualism. *Functional*
14 *Ecology*, 12: 459-464.
15
16 Turnbull L.A., Crawley M.J., Rees M. (2000). Are plant populations seed-limited? A
17 review of seed sowing experiments. *Oikos*, 88: 225-238.
18
19 van Doorn W.G. (1997). Effects of pollination on floral attraction and longevity.
20 *Journal of Experimental Botany*, 48: 1615-1622.
21
22 Vaughton G. (1996). Pollination disruption by European honeybees in the Australian
23 bird-pollinated shrub *Grevillea barklyana* (Proteaceae). *Plant Systematics and*
24 *Evolution*, 200: 89-100.
25
26 Vázquez D.P., Melián C.J., Williams N.M., Blüthgen N., Krasnov B.R., Poulin R.
27 (2007). Species abundance and asymmetric interaction strength in ecological networks.
28 *Oikos*, 116: 1120-1127.
29
30 Vázquez D.P., Morris W.F., Jordano P. (2005). Interaction frequency as a surrogate for
31 the total effect of animal mutualists on plants. *Ecology Letters*, 8: 1088-1094.
32

1 Velthuis H.H.W., van Doorn A. (2006). A century of advances in bumble bee
2 domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for
3 pollination. *Apidologie*, 37: 421-451.
4

5 Vergara C.H. (2008). Environmental impact of exotic bees introduced for crop
6 pollination. In *Bee Pollination in Agricultural Ecosystems*, Oxford University Press.
7

8 Vilá M., Bartomeus I., Dietzsch A.C., Petanidou T., Steffan-Dewenter I., Stout J.C.,
9 Tscheulin T. (2009). Invasive plant integration into native plant–pollinator
10 networks across Europe. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B:*
11 *Biological Sciences*, 276: 3887-3893.
12

13 Villanueva-Gutierrez R., Roubik D.W. (2004). Why are African honey bees and not
14 European bees invasive? *Apidologie*, 35: 481-491.
15

16 Vital M.V.C., Hepburn R., Radloff S., Fuchs S. (2012). Geographic distribution of
17 Africanized honeybees (*Apis mellifera*) reflects niche characteristics of ancestral
18 African subspecies. *Brazilian Journal of Nature Conservation*, 10: 184-190.
19

20 Waser N.M., Chittka L., Price M.V., Williams N.M., Ollerton J. (1996). Generalization
21 in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77: 1043-1060.
22

23 Walther-Hellwig K., Frankl R. (2000). Foraging habitats and foraging distances of
24 bumblebees, *Bombus* spp. (Hym., Apidae), in an agricultural landscape. *Journal of*
25 *Applied Entomology*, 124: 299-306.
26

27 Willmer P.J. (1986). Foraging patterns and water balance: problems of optimization
28 for a Xerophilic bee, *Chalicodoma sicula*. *Journal of Animal ecology*, 55: 941-962.
29

30 Willmer P.G., Bataw A.A.M., Hughes J.P. (1994). The superiority of bumble bees to
31 honeybees as pollinators: insect visits to raspberry flowers. *Ecological entomology*, 19:
32 271-284.
33

- 1 Wills R.T., Lyons M.N., Bell D.T. (1990). The European honey bee is Western
2 Australia Kwongan: foraging preferences and some implications for management.
3 *Proceedings of the Ecological Society of Australia*, Vol. 16.
4
- 5 Winfree R., Aguilar R., Vázquez D.P., LeBuhn G., Aizen M.A. (2009). A meta-analysis
6 of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90: 2068-2076.
7
- 8 Young H.J. (1988). Differential importance of beetle species pollinating *Dieffenbachia*
9 *longispatha* (Araceae). *Ecology*, 69: 832-844.
10
- 11 Young H.J., Young T.P. (1992). Alternative outcomes of natural and experimental high
12 pollen loads. *Ecology*, 73: 639-647.
13
- 14 Zuur A.F., Ieno E.N., Walker N.J., Saveliev A.A., Smith G.M. (2009). Mixed Effects
15 Models and Extensions in Ecology with R. Springer.
16
17