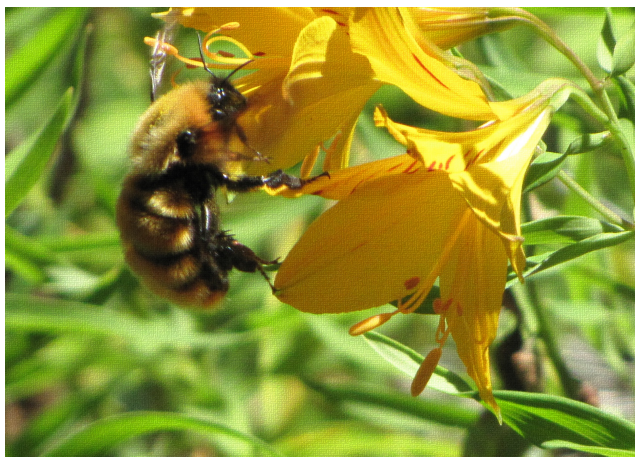




UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

**LA DECLINACIÓN DE ABEJORROS (*BOMBUS*)
Y SUS POTENCIALES CAUSAS, A DISTINTAS ESCALAS ESPACIALES**

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA



Autora: Lic. Marina P. Arbetman
Directora: Dra. Carolina L. Morales
Co-director: Dr. Marcelo A. Aizen

2017

RESUMEN

Tanto a nivel local como mundial los insectos polinizadores están sufriendo importantes declinaciones poblacionales, retracciones geográficas y extinciones. Esto pone en peligro no sólo a las especies en sí mismas, sino a la reproducción sexual de muchas plantas silvestres y al rendimiento de aproximadamente el 70% de los cultivos de habitual consumo humano.

Los abejorros (abejas sociales del género *Bombus*) son un grupo que motiva especial preocupación, tanto por su función como polinizadores de floras diversas, como también por su creciente papel en la polinización de cultivos en todo el mundo. Sin embargo, si bien los abejorros han sido percibidos como beneficiosos para mejorar la reproducción y el rendimiento de plantas y cultivos, existe una gran preocupación mundial sobre los impactos que las introducciones de especies no nativas de abejorros comerciales puedan generar sobre las especies de abejorros nativas. En particular, el comercio internacional basado en la producción masiva y en cautiverio de los abejorros, podría favorecer la propagación de enfermedades, la cual ha sido citada como posible causante de declinación poblacional de abejorros. Unas diez especies han sido introducidas en distintas partes del mundo, con resultados aparentemente negativos para las especies de abejorros nativos. Sin embargo, las evaluaciones a gran escala y a largo plazo de las consecuencias de tales introducciones son insuficientes. En nuestra región, *Bombus ruderatus* y *Bombus terrestris* se introdujeron secuencialmente en Chile y más tarde invadieron la región patagónica de Argentina. A partir de ese momento, se comenzó a observar una drástica declinación del único abejorro nativo de esta región, *Bombus dahlbomii*, el cual era muy abundante desde el norte de Neuquén hasta el extremo sur del continente.

En esta tesis evalué potenciales causas de declinación de abejorros a escala global y regional. A escala global, muestro que aproximadamente el 34% de la fauna de abejorros evaluados (44% del total) están declinando mundial o continentalmente. Sin embargo se observa que la disminución de las especies no está distribuida al azar en la filogenia. Las especies susceptibles están sobrerrepresentadas en el subgénero *Thoracobombus* (ca. 64%), y sub-representadas en el subgénero *Pyrobombus* (ca. 6%). Por otro lado, las

especies con áreas de distribución geográfica más reducidas muestran ser particularmente vulnerables a la declinación, al igual que las especies para las cuales no se han reportado ninguno de los tres parásitos patógenos más habituales en abejorros (*Crithidia bombi*, *Nosema spp* y *Locustacarus buchneri*). El patrón de contagio filogenético observado en la declinación a nivel mundial indica que la historia evolutiva y la diversidad genética asociada a ciertos clados podrían ser profundamente erosionadas de continuarse con la tendencia actual de declinación poblacional. A escala regional, estudios en la Patagonia revelan que, a sólo cinco años de su llegada, la especie altamente invasiva *B. terrestris* se ha convertido en el abejorro más abundante y extendido, y que su propagación coincide con la retracción geográfica de la única especie nativa, *B. dahlbomii*. Se reporta por primera vez la presencia del parásito *Apicystis bombi* en muestras de *B. ruderatus* y de *B. dahlbomii* recolectadas posteriormente a la invasión de *B. terrestris* (para el cual se encontró un 47% de individuos infectados), patógeno que no se detectó en las muestras de *B. dahlbomii* y *B. ruderatus* recolectadas previamente a dicha invasión. La identidad del parásito *A. bombi* fue corroborada por secuenciación de ADN correspondiente al marcador nuclear 18S, que resulta idéntica en las tres especies de abejorros, y coincide con secuencias ya publicadas registradas en individuos europeos. Por otro lado, al evaluar la variación genética del parásito mediante las regiones nucleares ITS1 y ITS2 se encuentra que se trata de una población poco estructurada genéticamente, en donde la ubicación geográfica explica sólo el 15% de la variación genética.

Para la región Patagónica, los resultados de esta tesis proporcionan evidencia indirecta de la posible relación entre la introducción de parásitos patógenos y el colapso poblacional y la retracción geográfica de *B. dahlbomii*. Aunque los datos no proporcionan información sobre la dirección de la transferencia, la ausencia de una marcada estructura genética espacial y de especificidad en los hospedadores sugiere que *A. bombi* podría estar causando una epidemia infecciosa emergente, propagada entre continentes a través de taxones de abejas. Los esfuerzos de conservación deberían centrarse en las especies pertenecientes a los clados susceptibles y en particular a las de área geográfica más pequeña. Dado que los abejorros

invasores pueden desplazar rápidamente a sus congéneres nativos y co-introducir enfermedades, se debería desalentar la introducción de especies de abejorros en regiones donde no son nativos. Por último, los mecanismos de tolerancia y resistencia a los parásitos patógenos deberían ser explorados urgentemente y en profundidad.

INDICE

Resumen.....	2
Capítulo 1:	
La polinización y los polinizadores.....	7
Polinizadores particulares: los abejorros	8
Importancia de los abejorros.....	9
Ciclo de vida.....	11
Particularidades del género <i>Bombus</i> y su relación con la vulnerabilidad	11
Breve historia evolutiva	12
Declinación de abejorros a nivel mundial.....	12
Hipótesis de declinación	13
Cambio climático.....	14
Comercio internacional y patógenos.....	14
Sinergia de los factores anteriores.....	15
Sistema en estudio.....	16
Especies en estudio.....	17
Objetivos	18
Referencias	20
Capítulo 2:	
La declinación mundial de las especies del género <i>Bombus</i>	25
Resumen.....	37
Introducción.....	28
Métodos	32
Filogenia y conjunto de datos	32
La señal filogenética y el papel de los predictores de declinación propuestos	35
Resultados	37
Tendencias globales.....	37
La señal filogenética y el papel de los predictores de declinación propuestos	38
Discusión.....	43
Referencias	56
Material suplementario.....	56
Capítulo 3:	
Reemplazo ecológico de la especie nativa <i>Bombus dahlbomii</i> por especies introducidas invasoras.	60
Resumen.....	61
Introducción.....	84
Materiales y métodos	66
Selección de la época de muestreo.....	66
Abundancia regional de abejorros	67
Tendencias temporales en la composición y abundancia local de abejorros, en flores de amancay en el valle del challhuaco.	68
Resultados	71
Patrones regionales	71
Patrones a largo plazo a escala local	72

Conclusiones.....	76
Referencias	80
Material suplementario.....	83
Tablas suplementarias	85

Capítulo 4

La introducción de parásitos patógenos como potencial causa de la declinación de <i>Bombus dahlbomii</i>	88
Resumen.....	89
Introducción.....	124
Métodos	93
Recolección de muestras.....	93
Métodos moleculares para la detección del patógeno.....	94
Métodos moleculares para determinar haplotipos de <i>A. bombi</i>	95
Resultados	96
Prevalencia de parásitos pre y post invasión de <i>Bombus terrestris</i>	96
Variación intraespecífica de <i>Apicystis bombi</i>	98
Discusión.....	101
Referencias	105
Material suplementario.....	108
Protocolo de PCR para detectar la presencia de <i>Apicystis bombi</i>	110

Capítulo 5:

Discusión general.....	111
Referencias	123
Agradecimientos	127

INTRODUCCIÓN GENERAL

La polinización y los polinizadores

Los polinizadores juegan un rol protagónico en los ecosistemas ya que se estima que la proporción de plantas polinizadas por animales en las zonas templadas es de un 78% y hasta un 94% en comunidades tropicales de plantas silvestres (Ollerton et al. 2011). También impactan directamente en nuestra vida cotidiana, ya que casi una $\frac{3}{4}$ parte de los cultivos de consumo humano (Klein et al. 2007) que representan el 35% del volumen de la producción mundial de cultivos, dependen de la polinización para su producción y/o aumento en la productividad (Potts et al. 2016). En consecuencia, si los polinizadores disminuyen en riqueza o abundancia, si reducen su rango de hábitat o si desaparecen, la diversidad global de las plantas, la estabilidad de los ecosistemas y la producción de alimentos junto con el bienestar de la humanidad, se verían seriamente afectados (Potts et al. 2010). La gran mayoría de las especies de polinizadores son silvestres, incluyendo más de 18.000 especies de abejas (Michener 2007). Es finalmente la abundancia y diversidad de estas especies las que promueven un servicio de polinización más eficiente (Garibaldi et al. 2014). Unas pocas especies de abejas (en sentido amplio, es decir pertenecientes a la superfamilia Apoidea) son manejadas con fines de polinización y en algunos casos también para la producción de miel, incluyendo la abeja occidental de la miel (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758), la abeja oriental de la miel (*Apis cerana* Fabricius, 1793), cinco especies de abejorros (principalmente *Bombus terrestris* Linnaeus, 1758), algunas abejas sin aguijón (tribu Meliponini) y solo tres abejas solitarias (*Nomia melanderi* Cockerell, 1906, *Megachile rotundata* Fabricius, 1787 y *Osmia cornifrons* Radoszkowski, 1887). La apicultura es una importante fuente de ingresos, que tiene a la abeja de la miel occidental como el polinizador manejado, más extendido mundialmente. Con aproximadamente 81 millones de colmenas se producen unos 1.6 millones de toneladas de miel al año, en todo el mundo (datos FAO, 2014). Sin embargo, los beneficios económicos que traen los polinizadores, exceden enormemente a los obtenidos gracias a la comercialización de los productos apícolas (miel, cera, propóleos, etc). Aunque es más difícil de cuantificar, la

diversidad de polinizadores contribuye a la eficaz polinización, permitiendo la formación de frutos y/o aumentando la productividad de muchos cultivos (Garibaldi et al. 2014). Como ejemplo, se estima que sólo en Estados Unidos, (sin tener en cuenta los polinizadores manejados) los polinizadores silvestres generan un valor anual de 57.000 millones de dólares por los servicios ecosistémicos brindados (Losey & Vaughan 2006).

Polinizadores particulares: los abejorros

Dentro de los polinizadores, en general y las abejas en particular, los abejorros (es decir, abejas sociales pertenecientes al género *Bombus*, Latreille; Hymenoptera: Apidae, Bombini) son un grupo particularmente importante por su rol como eficientes polinizadores (Williams 1998; Cameron et al. 2007). Estas abejas grandes, carismáticas y peludas, están agrupadas en 15 subgéneros (Williams 1998; Williams et al. 2008) y en total comprenden unas 260 especies. Los abejorros se distribuyen principalmente en regiones templadas y frías de Eurasia y de Norteamérica, pero también, si bien con menor diversidad, en Centro y Sudamérica.

El género *Bombus* se encuentra dentro de la tribu monotípica Bombini, que junto con Apini (abejas melíferas), Meliponini (abejas sin aguijón) y Euglossini (abejas de orquídeas), constituyen las abejas corbiculadas, que se distinguen por la estructura de transporte del polen (corbícula) en las patas posteriores. La hipótesis más reciente y detallada acerca de las relaciones filogenéticas de las especies incluidas en el género *Bombus* es la propuesta por Cameron y col. (2007) en base a datos moleculares, a partir de la cual Williams (2008) propone el nuevo agrupamiento de 15 subgéneros, en base a un reagrupamiento de los 38 reconocidos anteriormente.

El centro de origen y diversificación ha sido situado en Asia desde donde se cree se dispersaron sucesivas veces hacia otros continentes (Hines 2008). Si bien dicha región alberga la mayor riqueza de especies de abejorros a nivel mundial, es de la que menos información se dispone (Williams et al. 2016). Especies del género *Bombus* alcanzan el extremo norte de África, a lo largo de la cuenca del Mediterráneo, estando ausentes en el resto del continente. Si bien no existen especies nativas de abejorros en Oceanía en la actualidad

existen poblaciones de especies de origen europeo que fueron introducidas para polinizar cultivos y que actualmente se encuentran establecidas (Macfarlane & Gurr 1995).

En Sudamérica habitan unas 24 especies pertenecientes a este género, que hoy en día se agrupan dentro de dos subgéneros (*Cullumanobombus* y *Thoracobombus*). En la Argentina, en la actualidad, habitan diez especies de abejorros de este género, dos de las cuales (*Bombus ruderatus* Fabricius, 1775 y *B. terrestris*) son de origen europeo, y fueron introducidas recientemente en Chile en donde se establecieron y expandieron rápidamente (Cap. 3). La distribución de abejorros en Argentina es amplia, con el centro y norte del país como áreas de mayor diversidad, y con una notable reducción hacia la Patagonia andina y extraandina (Abrahamovich & Diaz 2002) en donde habita una única especie nativa, el abejorro gigante *Bombus dahlbomii* Guérin-Méneville, 1835, cuyas poblaciones estarían sufriendo retracciones geográficas (Ruz 2002).

Importancia de los abejorros

Importancia económica

La importancia económica que tienen los abejorros puede resumirse en dos grandes grupos. Por un lado tenemos al comercio internacional de abejorros, en donde se estima que por las ventas anuales de colonias de polinizadores (930,000 colonias de *B. terrestris*, unas 55,000 colonias de *Bombus impatiens* Cresson, 1863, y unas miles de *Bombus lucorum* Linnaeus, 1761, *Bombus ignitus* Smith, 1869, y *Bombus occidentalis* Greene, 1858) (Velthuis & van Doorn 2006) ha movilizado en 2004 unos 150 millones de dólares. Por otro lado están los servicios agrícolas de numerosos cultivos, cuya productividad fluctúa significativamente de acuerdo a la calidad de la polinización. Klein y colaboradores (2007) estimaron la dependencia de los cultivos con respecto a los polinizadores, y esto nos da una idea de cuánto puede aumentar o disminuir la cosecha en su ausencia (Figura 1). Si bien el cálculo de cuánto representa está abierto a debate (qué variables se deben tener en cuenta,

etc), estimaciones como la de Gallai y colaboradores (2009) arrojan valores que superan los 150.000.000.000 dólares anuales, lo cual representa aproximadamente el 9.5% del valor total de la producción agrícola. El valor que puede atribuirse a los polinizadores se observa también al comparar los precios promedio de una tonelada de cultivos que no dependen de la polinización (€151/tonelada) con aquellos que sí dependen en distinta medida de este servicio (€761/tonelada), o sea cinco veces más beneficioso (Gallai et al. 2009).

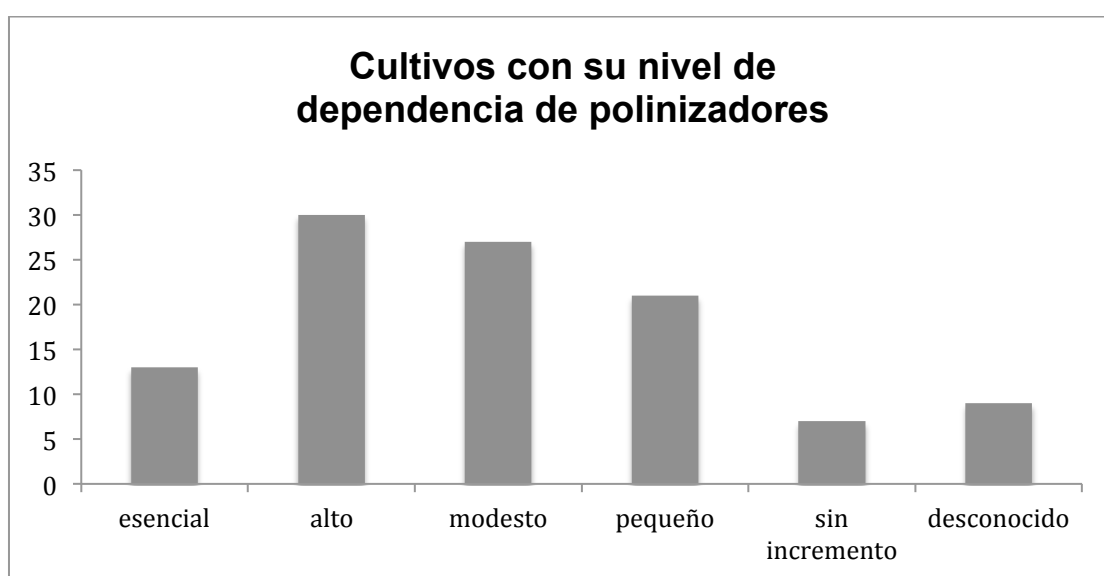


Figura 1: Nivel de dependencia en la polinización, de los cultivos más importantes, tomado de Klein y colaboradores de 2007. Los cultivos incluidos son los proporcionados por la FAO en 2004 y se agregaron los cultivos cuya producción supera los 4.000.000 de toneladas. Sólo se incluyen los cultivos que producen frutas o semillas para consume humano. No se incluyeron en este análisis los cultivos para alimentación animal, ni los cultivos conocidos que son polinizados por viento, autopolinizados o de reproducción vegetativa.

esencial: cultivos cuya reducción en la producción alcanza el 90% al comparar con vs sin polinizadores. alto: entre 40 y 90%; modesto: entre un 10 y un 40%; pequeño: una reducción de hasta el 10%; no incrementa: no hay incremento en la productividad con la polinización animal; desconocido: no hay trabajos empíricos

Importancia ecológica:

La visibilidad del rol ecológico de los abejorros ha aumentado debido a los impactos directos e indirectos que este grupo de abejas tiene en la economía.

Como se menciona arriba, la importancia económica ha sido resaltada en varias oportunidades, y numerosos estudios muestran el valor económico de los abejorros para la agricultura (Velthuis & van Doorn 2006; Klein et al. 2007). Sin embargo, es mucho más difícil cuantificar el valor que tienen para los hábitats naturales y en el mantenimiento de la biodiversidad en general (Costanza et al. 1997). Lo que sí está bien establecido es que la pérdida de polinizadores nativos tendría efectos en cascada sobre las comunidades de plantas (Biesmeijer et al. 2006) y sobre los organismos que dependen a su vez de ellas, tanto para su alimentación como para su supervivencia (Buchmann & Nabhan 1996).

Ciclo de Vida

En general el ciclo de vida es anual y comienza cuando una reina fecundada emerge de la hibernación. Luego de alimentarse, la reina comienza a buscar el lugar adecuado para establecer su nueva colonia, que usualmente son huecos en el suelo o debajo de raíces de árboles. Una vez encontrado el sitio, la reina se provee de polen con el que forma una masa donde ovipositará los huevos diploides que darán origen a las obreras. Después de 4-6 días de la oviposición, las larvas emergen de los huevos y se alimentan de polen y néctar recolectado por la reina. Las distintas especies difieren en la forma en la que se alimentan de polen, conocidas como “pocket makers” o “non pocket makers” (Sladen 1912). Las larvas progresan a través de varias mudas, y el desarrollo total involucra generalmente cuatro estadios dentro de sus celdas. Luego, cada larva fabrica una delicada cámara en donde se desarrolla y unos 15 días más tarde, aproximadamente, se forman los capullos cilíndricos en donde la larva empupa para luego emerger. Al final de la temporada, las reinas ponen nuevamente huevos (no fecundados) que ahora son haploides de donde saldrán los machos.

Particularidades de los abejorros y su relación con la vulnerabilidad

Las abejas del género *Bombus* son más vulnerables a la extinción que muchos otros taxa de animales, por varias razones, entre ellas, su carácter

colonial estacional y su ciclo de vida. Una de las características que los hacen vulnerables es el requerimiento de tres tipos de hábitats. Uno para forrajeo, otro para nidificar y otro para hibernar, todos en relativa cercanía; adicionalmente algunas especies necesitan de flores particulares para el forrajeo (Harder 1985). Otra característica es su largo ciclo de vida, con la generación de machos reproductores hacia el final de la temporada, lo que hace que pequeños cambios en la adquisición de recursos, puedan tener impactos drásticos que se expresan a lo largo del ciclo de vida. En consecuencia, la combinación de los ciclos haplo-diploide junto con su organización social (eusocial) y requerimiento de hábitats complejos hace que estas especies sean particularmente susceptibles (Packer & Owen 2001).

Breve historia evolutiva

Los abejorros son un grupo que, debido a la presencia de adaptaciones para su termorregulación, pueden ser considerados como endotérmicos facultativos (Heinrich 1975). La diversificación inicial de los linajes de abejorros existentes se estima tuvo lugar hace alrededor de 25 a 40 millones de años (MA), en el límite del Eoceno-Oligoceno (34 MA), un período de enfriamiento global muy drástico. Los análisis de dispersión predicen un antepasado en el Viejo Mundo con eventos de diversificación que se limitan en gran medida al Viejo Mundo Oriental, y con numerosos eventos de dispersión posteriores intercontinentales en dirección hacia el Nuevo Mundo y desde Norteamérica hacia Sudamérica (Hines 2008). Los primeros movimientos desde el Paleártico hacia el Neártico tuvieron lugar luego de 20 MA y pueden haber coincidido con un período de enfriamiento del Mioceno. Las dispersiones subsiguientes ocurrieron entre las especies boreales y las adaptadas a la tundra en los últimos cinco MA (Hines 2008).

Declinación de abejorros a nivel mundial

En distintas partes del mundo se han publicado trabajos que muestran que distintas especies de abejorros están declinando. En particular, trabajos de

Europa, muestran drásticas disminuciones de poblaciones, aunque llamativamente otras especies permanecen abundantes o sin cambios (Colla & Packer 2008; Gixti et al. 2009; Cameron et al. 2011; Williams 1982). Por ejemplo, de las 25 especies conocidas en el Reino Unido, tres están consideradas extintas localmente y al menos siete han disminuido significativamente en tiempos históricos (Williams 1982; Goulson et al. 2005). Las causas de la declinación de especies de abejorros no son totalmente comprendidas, y si bien algunas de las hipótesis de declinación propuestas han recibido cierto sustento, en particular en Europa, donde la fauna de abejorros está mejor estudiada, no existe un consenso mundial respecto de la importancia relativa de estas diferentes hipótesis.

Hipótesis de declinación

Transformación y pérdida del hábitat

Al ser los abejorros organismos que dependen por completo de las flores para obtener su alimento, los cambios en el uso de la tierra, en particular aquellos debidos a la intensificación de los cultivos, impactan directamente sobre ellos. Varios estudios en Europa (por ejemplo Kosior et al. 2008), en Estados Unidos (Gixti et al. 2009) y en Asia (Xie et al. 2008), muestran una correlación entre la diversidad y abundancia de flores y el número de especies de abejorros presentes. Estudios locales cuantitativos en el sur de las islas Británicas encontraron que la riqueza y la densidad de especies de abejorros son generalmente mayores en áreas semi-naturales, en comparación a sitios intensamente cultivados (Williams 1988). También los agroquímicos han tomado relevancia en los estudios relacionados a la declinación. En particular, pesticidas que contienen neonicotinoides (aunque existen otros también) son particularmente dañinos, causando efectos subletales que se expresan en una disminución en la eficiencia del forrajeo que afecta a toda la colonia (Blacquièrre et al. 2012) y una reducción del 85% en la producción de nuevas reinas (Whitehorn et al. 2012).

Cambio Climático

El cambio climático podría tener impactos negativos sobre los abejorros, tanto de manera directa, al afectar su fisiología y comportamiento, como indirecta, al propiciar cambios en la abundancia, distribución y disponibilidad de sus recursos. En cuanto a efectos directos, los abejorros son organismos adaptados a climas fríos por lo que un aumento en las temperaturas promedio, así como los golpes de calor, pueden tener efectos fisiológicos letales y subletales que pueden variar entre especies, como ha sido demostrado experimentalmente por Martinet y colaboradores (2015). En cuanto a efectos indirectos, estudios recientes han demostrado reducciones en las abundancias de las flores más visitadas por abejorros en ecosistemas de alta montaña en respuesta a mayores temperaturas (Miller-Struttmann et al. 2015).

Si bien se desconoce la importancia relativa de ambos mecanismos, los patrones de distribución de especies en Europa y Norteamérica, son consistentes con un efecto negativo del cambio climático. Un estudio reciente involucrando 67 especies de abejorros muestra que en ambas regiones las especies tienden a sufrir una retracción hacia el norte del límite sur de sus áreas de distribución, que no va acompañada con un avance en el mismo sentido de su límite norte. En otras palabras, las poblaciones se retraen en los márgenes más cálidos de su distribución pero no avanzan hacia sus límites más fríos. Esto sugiere una falta de ajuste a las condiciones de calentamiento imperantes en el hemisferio norte (Kerr et al. 2015).

Comercio internacional y patógenos

El comercio internacional de abejorros, que implica la cría en masa y condiciones artificiales y el transporte de colmenas entre regiones del mundo, incluso hacia regiones donde las especies no son nativas, puede tener impactos negativos en las especies de abejorros nativos. Entre dichos impactos se encuentran la competencia por los recursos (ya sea alimentarios, o de sitios de nidificación), la hibridación (entre especies o subespecies) y la transmisión de patógenos y parásitos (Colla et al. 2006; Goulson 2010;

Morales 2007). Este último mecanismo es actualmente un foco de atención a nivel global, dado que las enfermedades emergentes son consideradas como un actor fundamental en la crisis de polinizadores (Potts et al. 2010; Potts et al. 2016). Los abejorros portan naturalmente una amplia variedad de parásitos, cuya mayoría podría infectar múltiples especies de abejas de diferentes géneros. Sin embargo, la distribución geográfica y virulencia de los diversos patógenos no es bien conocida excepto para las especies usadas como modelo en estudios de laboratorio (e.g. *Bombus terrestris*, *B. lucorum*) (revisado en Goulson & Hughes 2015).

Los abejorros criados comercialmente suelen tener altos niveles y amplia variedad de patógenos ya que las altas densidades poblacionales en los sitios de cría favorecen el contagio dentro y entre colonias (Meeus et al. 2011). Existe evidencia de que incluso colonias comerciales ya instaladas en destino final y declaradas “*libres de patógenos*”, poseen una gran variedad de parásitos (Graystock et al. 2013) los cuales pueden contagiar tanto a abejorros como a las abejas de la miel. Otra vía de introducción de enfermedades puede ser el suministro a las colonias de *Bombus* de suplementos alimenticios basados en polen cosechado en colmenas de *Apis mellifera*.

Cuando especies de abejorros son introducidas en regiones en las que no son nativas, sus parásitos son co-introducidos juntos con sus hospedadores. Este fenómeno ha sido ya reportado en varias oportunidades en colonias comerciales de *B. terrestris* introducidas en distintos países del mundo: (Plischuk & Lange 2009, reportan a *Crithidia bombi* y *Apicystis bombi*); (Schmid-Hempel et al. 2014, reportan a *Crithidia bombi*); (Goka et al. 2006, Goka et al. 2001, reportan a *Locustacarus buchneri* en Japón). En resumen, la introducción de abejorros no nativos implica un riesgo comprobado de co-introducción de nuevas enfermedades que pueden afectar gravemente a otros polinizadores.

Sinergia de los factores anteriores

Para complejizar el cuadro, los factores que afectan a los abejorros no actúan por separado, sino que pueden interactuar de forma sinérgica. Por ejemplo

Graystock y col. (2015) muestran como el virus deformador de alas (DWV) y el parásito neogregarine *Apicystis bombi* son mucho más letales cuando están presentes simultáneamente que cuando se los encuentra por separado. También Goulson y col. (2015) alertan sobre la exposición a pesticidas, que pueden activar los mecanismos de detoxificación y la respuesta inmune, lo que puede traducirse en una susceptibilidad a parásitos. Estos ejemplos ilustran la potencial complejidad de los factores involucrados y alertan sobre la necesidad de estudiarlos en conjunto.

Sistema en estudio:

La región andino-patagónica, se encuentra ubicada en el sur-oeste de Argentina. La misma se caracteriza por un fuerte gradiente de precipitación que disminuye abruptamente de oeste a este en pocos kilómetros, ya que la cordillera de los Andes intercepta los vientos del Pacífico que en esas latitudes vienen cargados de humedad y que se descarga en las montañas en forma de lluvia y nieve. Tanto es así, que, en el Noroeste de dicha región, en la Provincia de Río Negro, en Puerto Blest y Laguna Frías las precipitaciones suelen alcanzar hasta los 3.000-4.000 milímetros anuales, mientras que a sólo 50 kilómetros hacia el este, esos valores decrecen a 300-500 milímetros. Los bosques andino-patagónicos ocupan una franja estrecha que recorre el macizo cordillerano desde el norte de Neuquén hasta Tierra del Fuego. Al igual que del lado este (en Chile), en las zonas más húmedas del oeste de la cordillera dominan las especies del género *Nothofagus* (e.g., ñire, raulí, roble, lengas y coihues, dependiendo de la latitud, altitud y condiciones edáficas) (Donoso 1987) y hacia el este son reemplazadas por los bosques de *Austrocedrus chilensis* (el Ciprés de la Cordillera) (Dezzotti & Sancholuz 1991) que limitan con la estepa patagónica.

Especies en estudio:



Figura 2: *Bombus dahlbomii* en Amancay (*Alstroemeria aurea*).

Bombus dahlbomii (Guérin-Ménéville, 1835) (Figura 2), cuyo nombre homenajea al científico sueco M. Dahlbom (Figura 3), es la especie de abejorro nativo más austral del mundo. Esta especie habita aproximadamente desde los 30°S hasta el extremo sur de Sudamérica, y es la única especie nativa del sur de Argentina y Chile (Abrahamovich et al. 2001). Hoy en día, el rango geográfico de *B. dahlbomii* se superpone parcialmente con el de dos especies de abejorros invasores introducidos (ver Figura 2 del Capítulo 3 de esta tesis): los europeos *B. ruderatus* y *B. terrestris* (Abrahamovich et al. 2001; Montalva et al. 2011). Esta especie nativa ha mostrado una fuerte declinación coincidente con la invasión y la propagación de ambas especies introducidas (Capítulo 3 de esta tesis y véase también Ruz 2002; Morales 2007; Montalva et al 2011)

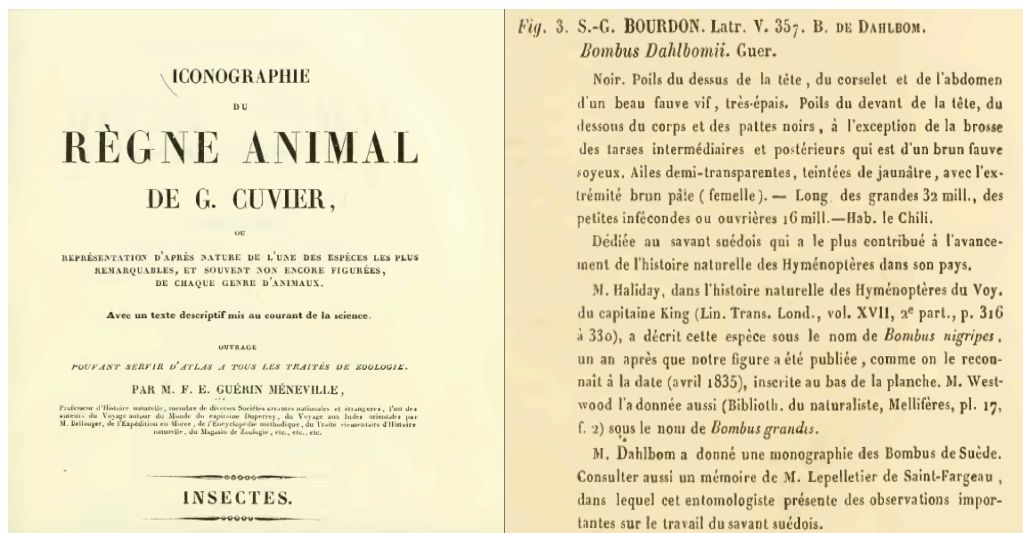


Figura 3: Primera descripción científica de *B. dahlbomii* en “Iconografía del reino animal” Cuvier (1829 a 1838). “...el pelo por encima de la cabeza, el tórax y el abdomen de un hermoso color de cervatillo brillante, muy espeso”.



Figura 4: *B. ruderatus* en trébol rojo (*Trifolium pratense*)

Bombus ruderatus Fabricius, 1775, se introdujo en Chile en la década de '80 a partir de poblaciones naturalizadas previamente en Nueva Zelanda (Arretz & Macfarlane 1986). Fue registrada por primera vez asilvestrada en el noroeste de la Patagonia de Argentina, cerca de la frontera con Chile en 1994 (Roig-Alsina & Aizen 1996), y en unos pocos años se volvió más abundante que *B. dahlbomii* (Madjidian et al. 2008; Morales 2007).

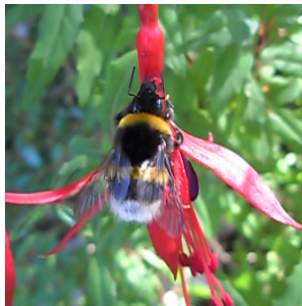


Figura 5: *B. terrestris* robando néctar en *Fuchsia magellanica*

En el caso de *B. terrestris* Linnaeus, 1758, desde 1997 sus colonias son importadas hacia Chile para la polinización de cultivos (Ruz 2002), con un promedio anual de 16.650 colonias, que provienen de distintas compañías y países que incluyen Bélgica, Holanda, Israel, Eslovaquia y España, llegando a importarse unas 39.000 colonias en 2015 (Fuente: SAG de Chile, fecha de acceso: 14 June 2016 y IUCN *B. dahlbomii* Redlist). En 2006 fue reportado por primera vez en la naturaleza, en el noroeste de la Patagonia Argentina (Torretta et al. 2006). Sin embargo, se desconoce el alcance de dicha invasión y sus impactos sobre la especie nativa y los potenciales mecanismos subyacentes.

OBJETIVOS:

El objetivo general de esta tesis es estudiar, a distintas escalas espaciales, patrones de declinación de abejorros y explorar algunas de las hipótesis sobre los factores involucrados en su declinación evaluando, en particular, el rol de los patógenos en la declinación de la especie nativa *Bombus dahlbomii*.

Para ello se plantearon tres objetivos particulares:

1. Explorar los patrones de declinación mundial de abejorros nativos y su relación con algunos predictores de dicha declinación.
2. Documentar si las poblaciones del único abejorro nativo presente en la Patagonia están declinando, y si esto es así:
3. Explorar la posible co-introducción de enfermedades por las especies de abejorros invasoras, como potencial causa de dicha declinación.

REFERENCIAS

- Abrahamovich, A.H. & Diaz, B., 2002. Bumble bees of the Neotropical Region (Hymenoptera: Apidae). *Biota Colombiana*, 3(2), pp.199–214.
- Abrahamovich, A.H., Tellería, M.C. & Díaz, N.B., 2001. *Bombus* species and their associated flora in Argentina. *Bee World*, 82(2), pp.76–87.
- Arretz, P. V & Macfarlane, R.P., 1986. The introduction of *Bombus ruderatus* to Chile for red clover pollination. *Bee World*, 67, pp.15–22.
- Biesmeijer, J.C. et al., 2006. Parallel Declines in Pollinators and Plants. *Science*, 313(July), pp.351–354.
- Blacquière, T. et al., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), pp.973–92.
- Buchmann, S.L. & Nabhan, G.P., 1996. The pollination crisis. *The Sciences*, 36(3), pp.22–27.
- Bumblebee Specialist Group, *BBSG Annual Report 2015*,
- Cameron, S.A. et al., 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp.1–6.
- Cameron, S.A., Hines, H.M. & Williams, P.H., 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(1), pp.161–188.
- Colla, S.R. et al., 2006. Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation*, 129(4), pp.461–467.
- Colla, S.R. & Packer, L., 2008. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodiversity and Conservation*, 17(6), pp.1379–1391.
- Costanza, R. et al., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 138, pp.253–260.
- Dezzotti, A. & Sancholuz, L., 1991. Los bosques de *Austrocedrus chilensis* en Argentina: ubicación, estructura y crecimiento. *Bosque*, 12(2), pp.43–52.
- Donoso, C., 1987. Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque*, 8(2), pp.85–97.

- FAO, 2014. www.fao.org/faostat/en/?#data/QL
- Gallai, N. et al., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), pp.810–821.
- Garibaldi, L.A. et al., 2014. From research to action: Enhancing crop yield through wild pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(8), pp.439–447.
- Goka, K. et al., 2001. Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*, 10(8), pp.2095–2099.
- Goka, K., Okabe, K. & Yoneda, M., 2006. Worldwide migration of parasitic mites as a result of bumblebee commercialization. *Population Ecology*, 48(4), pp.285–291.
- Goulson, D. et al., 2005. Causes of rarity in bumblebees. *Biological Conservation*, 122(1), pp.1–8.
- Goulson, D., 2010. *Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation* Second Edi., Oxford: Oxford University Press.
- Goulson, D. et al., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *ScienceExpress*, 2010(February), pp.1–16.
- Goulson, D. & Hughes, W.O.H., 2015. Mitigating the anthropogenic spread of bee parasites to protect wild pollinators. *Biological Conservation*, 191(July), pp.10–19.
- Graystock, P. et al., 2013. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology*, 50(5), pp.1207–1215.
- Grixti, J.C. et al., 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biological Conservation*, 142(1), pp.75–84.
- Harder, L.D., 1985. Morphology as a predictor of flower choice by bumble bees. *Ecology*, 66(1), pp.198–210.
- Heinrich, B., 1975. Thermoregulation in bumblebees. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 96(2), pp.155–166.
- Hines, H.M., 2008. Historical biogeography, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae:

- Bombus*). *Systematic biology*, 57(1), pp.58–75.
- IUCN Red List. www.iucnredlist.org/details/212151420/0
- Kerr, J.T. et al., 2015. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science*, 349(6244), pp.177–180.
- Klein, A.-M. et al., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 274(1608), pp.303–13.
- Kosior, A. et al., 2007. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. *Oryx*, 41(1), p.79.
- Kosior, A. et al., 2008. Long-term changes in the species composition and distribution of Bombini (Apidae) in Cracow since the mid 1850s. *Annales de la Société Entomologique de France*, 44(4), pp.393–407.
- Losey, J.E. & Vaughan, M., 2006. The economic value of ecological services provided by insects. *BioScience*, 56(4), pp.311–323.
- Macfarlane, R.P. & Gurr, L., 1995. Distribution of bumble bees in New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 18.
- Madjidian, J.A.J.A., Morales, C.L. & Smith, H.G., 2008. Displacement of a native by an alien bumblebee: Lower pollinator efficiency overcome by overwhelmingly higher visitation frequency. *Oecologia*, 156(4), pp.835–845.
- Martinet, B. et al., 2015. A protocol to assess insect resistance to heat waves, applied to bumblebees (*Bombus* Latreille, 1802). *PLoS ONE*, 10(3), pp.1–9.
- Meeus, I. et al., 2011. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Conservation Biology*, 25(4), pp.662–671.
- Michener, C.D., 2007. *The Bees of the World*. 2nd,
- Miller-Struttman, N.E. et al., 2015. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science*, 78(2010), pp.75–78.
- Montalva, J. et al., 2011. Geographic distribution and associated flora of native and introduced bumble bees (*Bombus* spp.) in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 50(1), pp.11–21.
- Morales, C.L., 2007. Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: causas,

- consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecologia Austral*, 17, pp.51–65.
- Ollerton, J., Winfree, R. & Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), pp.321–326.
- Packer, L. & Owen, R., 2001. Population genetic aspects of pollinator decline. *Conservation Ecology*, 5(1), p.4.
- Plischuk, S. et al., 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera : Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), pp.131–135.
- Potts, S.G. et al., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), pp.345–353.
- Potts, S.G. et al., 2016. *IPBES: Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production.*,
- Roig-Alsina, A. & Aizen, M.A., 1996. *Bombus ruderatus* Fabricius, un nuevo *Bombus* para la Argentina (Hymenoptera: Apidea). *Physis*, 5, p.49–50.
- Ruz, L., 2002. Bee Pollinators Introduced to Chile: a Review. In K. P. & I. F. VL, ed. *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. Brasilia: Ministry of Environment / Brasília, pp. 155–167.
- Schmid-Hempel, R. et al., 2014. The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *The Journal of animal ecology*, 83(4), pp.823–837.
- Sladen, F.W.L., 1912. *The Humble-bee. Its life-history and how to domesticate it*, Toronto: The Macmillan Co. of Canada.
- Torretta, J.P., Medan, D. & Abrahamovich, A.H., 2006. First record of the invasive bumblebee *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in Argentina. *Transactions of the American Entomological Society*, 132(3/4), pp.285–289.
- Velthuis, H. & van Doorn, A., 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4), pp.421–451.
- Whitehorn, P.R. et al., 2012. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science*, 336(6079), pp.351–

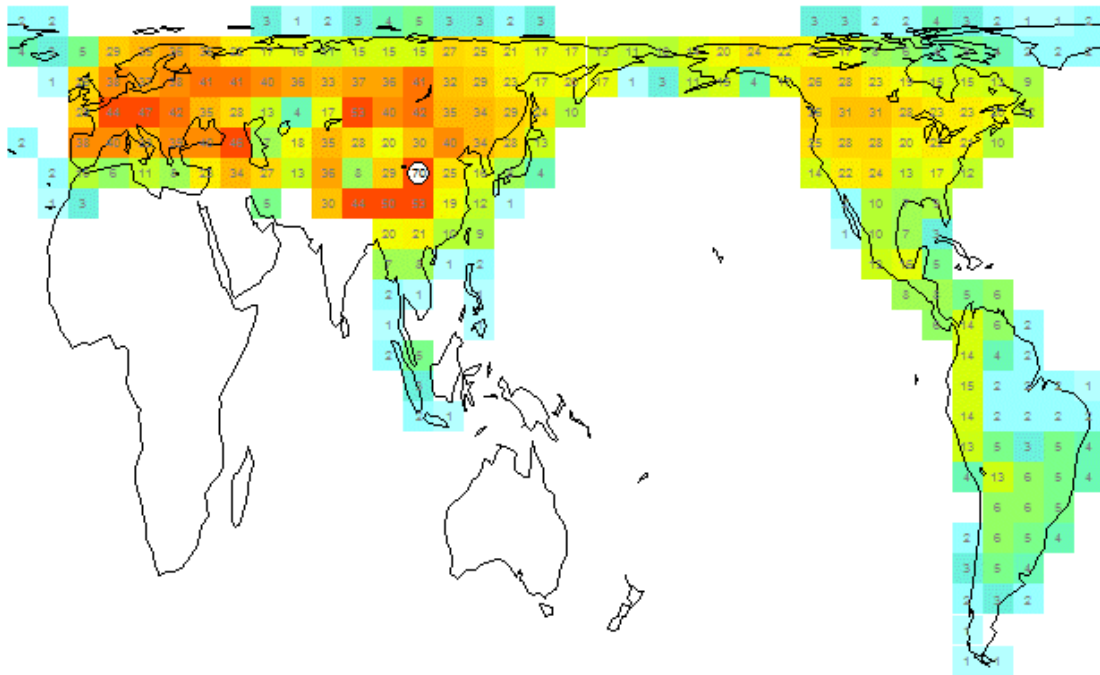
352.

- Williams, P.H., 1982. The Distribution and Decline of British Bumblebees. *Journal of Apicultural Research*, 21(4), pp.236–245.
- Williams, P.H., 1988. Habitat use by bumblebees (*Bombus* spp.). *Ecological Entomology*, 13(2), pp.223–238.
- Williams, P.H. et al., 2008. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39(1), pp.46–74.
- Williams, P.H., Huang, J. & Jiandong, A., 2016. Bear Wasps of the Middle Kingdom: A Decade of Discovering China's Bumble Bees. Available at: <https://entomologytoday.org/2016/10/28/bear-wasps-of-the-middle-kingdom-a-decade-of-discovering-chinas-bumble-bees/>.
- Xie, Z., Williams, P.H. & Tang, Y., 2008. The effect of grazing on bumblebees in the high rangelands of the eastern Tibetan Plateau of Sichuan. *Journal of Insect Conservation*, 12(6), pp.695–703.



CAPÍTULO 2

LA DECLINACIÓN MUNDIAL DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *BOMBUS* ESTÁ ESTRUCTURADA FILOGENÉTICAMENTE



Tomado del sitio del Museo de Historia Natural de Londres, P. Williams:

<http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/bombus/introduction.html>

El mapa muestra la distribución de las especies en el mundo, con los colores más cálidos representando más cantidad de especies.

RESUMEN

Las abejas nativas están declinando, tanto a nivel local como global, lo que puede perjudicar la reproducción sexual de aproximadamente el 80% de todas las especies de plantas silvestres y el rendimiento del 70% de los cultivos más ampliamente sembrados en el mundo. En particular, la declinación de abejorros (es decir, la reducción de la abundancia y/o la retracción geográfica de las especies del género *Bombus*) es de gran preocupación, dada su importancia como polinizadores clave en muchas de las floras del mundo, pero también debido su papel como polinizadores de cultivos. Para explorar los patrones de declinación y potenciales predictores del mismo dentro de este género, se compiló y analizó una base de datos que representa aproximadamente el 44% de la fauna global de abejorros compuesta por ~260 especies conocidas. Se utilizaron evaluaciones públicas regionales y globales para el riesgo de extinción de especies, que cumplen con los criterios y categorías de la lista roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y se incorporó información sobre variables que presumiblemente están asociadas a la declinación de las especies. Se exploró la relación de la filogenia en el patrón observado de declinación de abejorros, y su relación con los predictores potenciales de su declinación. Más específicamente, se evaluó la magnitud de la señal filogenética de la declinación dentro del género *Bombus*, así como en los rasgos de las especies que predecirían o estarían asociados a factores que explicarían esta declinación, incluyendo el tamaño del área geográfica que ocupa cada especie, la longitud de su lengua, y la presencia de parásitos internos. Luego, se probaron las relaciones entre la declinación de las especies y estos predictores específicos, usando regresiones logísticas filogenéticas. En general, el ~34% de la fauna evaluada de abejorros está declinando a escala regional o global. Sin embargo, las especies en declinación no se encontraron distribuidas aleatoriamente en la filogenia. Las especies susceptibles estuvieron sobrerrepresentadas en el subgénero *Thoracobombus* (con aproximadamente el 64% de sus especies declinando) y subrepresentadas en el subgénero *Pyrobombus* (con aproximadamente el 6%). Las especies con áreas geográficas más pequeñas e,

inesperadamente, aquellas donde no se han reportado patógenos internos fueron particularmente vulnerables. Un patrón filogenético contagioso de declinación implica que la historia evolutiva y su diversidad genética asociada, podrían erosionarse profundamente si las especies declinantes finalmente se extinguen. Los esfuerzos de conservación deberían entonces dirigirse, en particular, a las especies pertenecientes a clados susceptibles. Además, la calidad del hábitat de las especies que ocupan rangos pequeños debe ser monitoreada continuamente para evitar rápidas retracciones geográficas de las especies que pertenecen al género *Bombus*. Así mismo, resulta prioritario estudiar los mecanismos que explican la susceptibilidad de las especies de abejorros a patógenos comunes y nuevas enfermedades emergentes.

INTRODUCCIÓN

Los polinizadores aseguran la reproducción sexual de cerca del 80% de las plantas silvestres (y en mayor proporción en las comunidades tropicales) (Ollerton et al. 2011) y el rendimiento de alrededor del 70% de los 57 principales cultivos del mundo (Klein et al. 2007). Desde las últimas décadas se percibe un aumento en la valoración de diversos ensamblajes de polinizadores debido a su papel protagónico tanto en el mantenimiento de la biodiversidad terrestre, así como también en los rendimientos de los cultivos alimentarios (Garibaldi et al. 2014; Potts et al. 2016). Muchas especies de polinizadores están declinando a escala local, regional, continental y global (Kevan & Viana 2003; Potts et al. 2010; Bartomeus et al. 2013; Brown et al. 2016; Potts et al. 2016), con consecuencias para la persistencia de floras dependientes de polinizadores (Biesmeijer et al. 2006) y la productividad agrícola en general (Aizen & Harder 2009; Garibaldi et al. 2011; Garibaldi et al. 2013)

Entre las abejas, para muchas especies de abejorros, se han documentado descensos en abundancia y retracciones en sus rangos geográficos, (Williams & Osborne 2009; Cameron et al. 2011; Kerr et al. 2015). La declinación de abejorros en particular es motivo de gran preocupación, no sólo por su importancia como polinizadores eficientes de miles de plantas silvestres, particularmente de las floras templadas y de alta montaña (Goulson et al. 2008a), sino también por su creciente papel en la polinización de cultivos a nivel global (Garibaldi et al 2016).

Existe evidencia creciente de declinaciones generalizadas en especies de este género procedentes de estudios independientes de todas las regiones habitadas por abejorros (Sárospataki et al. 2005; Kosior et al. 2007; Goulson et al. 2008b; Xie et al. 2008; Cameron et al. 2011; Colla et al. 2012; Morales et al. 2013). Sin embargo, la mayoría de los estudios reportan evidencia de declinaciones locales o regionales de algunas poblaciones de especies, proporcionando así una imagen fragmentaria del estado de situación y de la vulnerabilidad del género en su conjunto. Este panorama también impide obtener conclusiones generales sobre los factores dominantes, si los hubiere, que puedan causar la declinación a escala global.

Para disminuir esta brecha, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha puesto en marcha un esfuerzo de colaboración internacional a través del Grupo Especialista de Abejorros (BBSG: <https://www.iucn.org/ssc-groups/invertebrates/bumblebee-specialist-group>), con el objetivo de evaluar el estado de riesgo de extinción de todas las especies de abejorros de acuerdo con los criterios y categorías de la Lista Roja de la UICN, un proceso conocido como "Red-Listing". Este tipo de evaluación utiliza estándares similares para todas las especies y, por lo tanto, permite comparar, proyectar patrones y probar hipótesis sobre las causas de la declinación de las especies. La evaluación del riesgo de declinación de las especies de abejorros, de acuerdo con los criterios de la UICN, ha avanzado rápidamente en los últimos años.

En un trabajo pionero, Williams & Osborne (2009) revisaron la evidencia para la declinación mundial de todas las especies de abejorros y su rangos en todo el mundo, usando las categorías de las Listas Rojas de la UICN y en donde evaluaron su riesgo de extinción. A pesar de que la mayor parte de las especies de abejorros viven en Asia (Bumblebee Specialist Group) y aún no han sido evaluados su estatus de conservación según los criterios de la UICN, las evaluaciones globales de 56 especies de abejorros que habitan (aunque sea en parte) en Asia, han sido publicadas recientemente en las Listas Rojas de la UICN. Otras dos iniciativas recientes han tenido lugar a escala continental. En una de ellas, la Comisión Europea de la UICN ha evaluado el estatus de 68 especies de abejorros en Europa (Nieto et al. 2014). En la otra, la Sociedad Xerces evaluó el estado de riesgo de extinción de 46 especies de abejorros norteamericanos (Hatfield et al. 2015). En este sentido, se utilizaron estas evaluaciones públicas y libremente disponibles, para evaluar los patrones de declinación y algunas de las hipótesis de las causas y los correlatos de la declinación más conocidas dentro de un marco filogenético.

Las hipótesis que intentan explicar la declinación observada de una especie de *Bombus* dada, o por qué algunas especies están más en riesgo que otras, se centran en factores extrínsecos que amenazan la persistencia de las especies, frecuentemente llamados "causas" o "motivos", o en factores intrínsecos conocidos como "correlatos" de la declinación (Goulson et al.

2005; Fitzpatrick et al. 2007; Williams et al. 2009; Williams & Osborne 2009). El cambio climático, las prácticas agrícolas modernas (que conducen a la pérdida de abundancia y/o a la diversidad de plantas), así como las enfermedades y patógenos, están entre las principales causas de declinación propuestas (Williams et al. 2009), mientras que rasgos como un rango climático estrecho y una alta especialización en el uso de los recursos están citados como los correlatos más frecuentes en la declinación de las especies (Williams & Osborne 2009; Williams et al. 2009). Dado que los correlatos de algún modo reflejan la susceptibilidad de las especies a ciertas causas, los primeros suelen utilizarse como aproximaciones (proxys) para probar hipótesis sobre la influencia de estos últimos en la declinación de las especies (por ejemplo, Williams 2005).

Se ha propuesto a la contracción del área de distribución geográfica, relacionada entre diferentes factores, con los cambios climáticos, para explicar la declinación de poblaciones de diversas especies (Parmesan 2006). Se espera que los abejorros en particular, como organismos adaptados al frío (Michener 2007), sean altamente vulnerables al actual cambio climático. Un estudio reciente propuso un vínculo entre los cambios en los rangos geográficos de las especies de abejorros y el cambio climático en Europa y América del Norte durante el último siglo (Kerr et al. 2015). Por lo tanto, el cambio climático podría poner en peligro la supervivencia de las especies que ocupen pequeños rangos geográficos, de los cuales se espera habiten también nichos climáticos más pequeños (Williams et al. 2007).

Además, la transformación del hábitat podría conducir a una reducción o pérdida de recursos florales para los abejorros, afectando a aquellas especies con dietas más especializadas. Dado que la lengua es el órgano involucrado en forma directa en la obtención del néctar, su principal fuente de energía, se espera que la longitud de la lengua esté estrechamente relacionada con el grado de especialización trófica en abejorros. Mientras que las especies de abejorros con lenguas largas parecen estar limitadas a extraer néctar de flores de corolas largas, los abejorros con lenguas cortas a menudo parecen ser capaces de explotar una mayor diversidad de especies de plantas (Heinrich 1976; Goulson & Darvill 2004; Miller-Struttman 2015 et al. y referencias ahí citadas). Esto incluye flores con corola profunda a través

del robo de néctar que permite sortear la restricción impuesta por la longitud de la corola a abejorros con lengua corta (Maloof & Inouye 2000; Williams 2005) si bien, Harder (1985) encontró el patrón opuesto, con abejorros de lengua corta más especializados, que los generalistas de lengua corta. Por lo tanto, se podría esperar que la probabilidad de declinación esté positivamente relacionada con el largo de la lengua. A pesar de que los intentos de demostrar esta relación no han sido concluyentes (Williams et al. 2009), esta es la primera vez que esta relación se aborda dentro de un marco filogenético y utilizando una fauna de abejorros, unas dos veces mayor que la evaluada en dicha oportunidad.

Por último, las enfermedades pueden reducir la supervivencia de los abejorros y la fecundidad de sus colonias (Imhoof & Schmid-Hempel 1999; Rutrecht & Brown 2008; Graystock et al. 2013). Los efectos sub-letales de las enfermedades en las castas no reproductivas (por ejemplo, las obreras) también pueden perjudicar el crecimiento de las colonias, con posibles efectos negativos a nivel de la población (Otterstatter et al. 2005). Por lo tanto, algunos autores sugirieron que la susceptibilidad a los parásitos internos (por ejemplo, *Crithidia bombi*, *Nosema sp.*, *Locustacarus buchneri*) podría explicar la declinación de las poblaciones observadas en algunas especies de *Bombus* (Kissinger et al. 2011; Meeus et al. 2011; Schmid-Hempel et al. 2014).

Utilizando diferentes fuentes publicadas con evaluaciones del riesgo de extinción, se estableció el estado de conservación de más de 100 especies de abejorros de acuerdo con los criterios de la UICN. Combinando los datos del estado de conservación junto con la filogenia global de *Bombus* más completa que existe (Cameron et al. 2007; Hines 2008), se realizó el primer análisis filogenéticamente controlado de patrones de declinación global en este género. Primero se determinó si las declinaciones de especies se encontraban o no distribuidas aleatoriamente entre los linajes. Se determinó un patrón de declinación filogenéticamente contagioso lo cual condujo a identificar qué clados eran más susceptibles, y por lo tanto son más vulnerables. En segundo lugar, se exploró si las hipótesis existentes de la declinación de *Bombus* relacionadas con el tamaño del área geográfica de la especie, la longitud de la lengua, y la presencia de patógenos seguían un

patrón filogenético no aleatorio que pudiera explicar las declinaciones si las hubiere. Mi predicción es que las especies que habitan aéreas geográficas más pequeñas, que albergan parásitos y tienen lenguas más largas son más propensas a declinar.

MÉTODOS

Filogenia y conjunto de datos

Se realizaron todos los análisis utilizando la filogenia calibrada de *Bombus* más completa (es decir, un árbol filogenético con longitudes de rama calibradas en el tiempo) publicado hasta la fecha, que incluye 219 especies de *Bombus* (Cameron et al. 2007; Hines 2008). Después de considerar sinónimos siguiendo la propuesta de Williams y col. (2008) (Tabla S1), se obtuvo una filogenia de 201 especies. Esta filogenia fue recortada para que coincidiera con el subconjunto de especies con estatus del riesgo de extinción conocido, así como con los subconjuntos de especies con información disponible de los rasgos elegidos como predictores (es decir, el tamaño del área geográfica, la longitud de la lengua y la presencia de parásitos). La clasificación de subgéneros (Tabla S1) también siguió los criterios propuestos por Williams y col (2008). Se definió el estado de declinación como una variable categórica con dos niveles: "declina" (codificada como 1 en las regresiones logísticas) y "no declina" (codificada como 0), usando las categorías de la Lista Roja de la UICN (Figura 1), para asignar a las especies a uno de estos dos niveles. Las especies clasificadas en las categorías de lista roja de la UICN "en peligro crítico de extinción" (CR), "en peligro de extinción" (EN), "vulnerable" (VU) y "casi amenazada" (NT) fueron asignadas al nivel "declina". Las clasificadas como de "preocupación menor" (LC) se asignaron a la categoría "no declina". Sólo tres especies de la base de datos pertenecían a la categoría NT; se decidió codificar estas especies como "declina", porque dos de estas tres especies tienen una tendencia de "declinación de sus poblaciones" según la evaluación de la UICN. El tercero con categoría NT, fue *Bombus laesus*, el cual es considerado sinónimo de *Bombus mocsaryi*, con categoría que es

“EN” (ambas categorías determinadas por la evaluación europea). No se incluyeron en este estudio las especies clasificadas como con "Datos deficientes" (DD), y ninguna especie de abejorro fue clasificada como "Extinta" (EX), o "Extinto en la naturaleza" (EW).

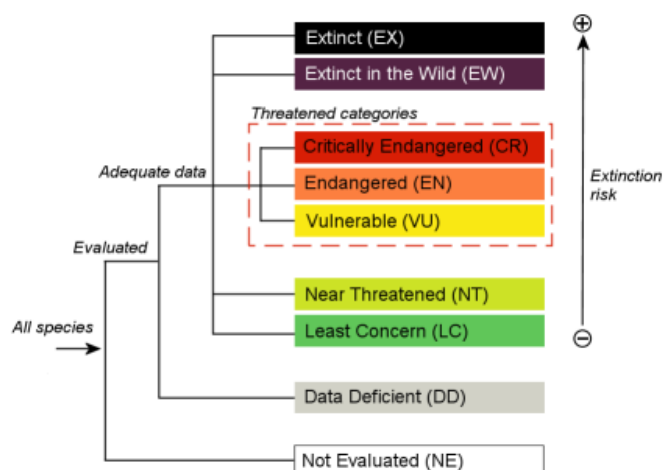


Figura 1: Todas las categorías de riesgo de extinción según la UICN.

Crédito: IUCN

<http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria/2001-categories-criteria#categories>

Se utilizaron todas las evaluaciones del estado de declinación que utilizaron los criterios de la UICN disponibles para el continente o para todo el mundo (Williams & Osborne 2009; Hatfield et al. 2015; Nieto et al. 2014) para construir una base de datos de 111 especies con estado de declinación conocido. Cuando más de un grupo científico evaluó el estado de conservación de una especie y surgieron discrepancias, se adoptó un criterio menos conservador y se mantuvo la categoría de mayor amenaza (por ejemplo, *B. bohemicus* fue categorizado como "LC" por la evaluación europea de la UICN y como "CR" por la Sociedad Xerces, y por lo tanto, se consideró a esta especie como "CR"). Cuando alguna especie (*B. balteatus*, *B. cryptarum*, *B. distinguendus*, *B. flavidus*, *B. hyperboreus*, *B. polari*) fue categorizada como DD por una evaluación, pero categorizadas con un riesgo de declinación (cualquiera de ellos) por otra fuente, se adoptó la categorización del estado de declinación diferente de la categoría "DD".

Se utilizaron datos no publicados sobre el tamaño del área geográfica de las especies compilado y facilitado por el investigador Paul Williams del “Natural History Museum”, de Londres, con el cual se estableció una colaboración. El tamaño del área geográfica se definió como el número de celdas ocupadas por una especie de abejorro dado sobre la base de registros históricos, cubriendo cada celda aprox. 611.000 km². Según la UICN 2016, el tamaño del área de hábitat es el área dentro de su extensión de ocurrencia, la cual está ocupada por un taxón. Dado que el área de ocupación, combinada con otros factores, es uno de los criterios que a veces se aplican para considerar las especies en alguna de las categorías de riesgo de extinción mencionadas anteriormente (IUCN Redlist), la inclusión de especies clasificadas sobre la base de este criterio podría dar lugar a una circularidad a la hora de intentar predecir la declinación en función del área geográfica de las especies. Sin embargo, en la base de datos, sólo cinco especies (*B. alpinus*, *B. gerstaeckeri*, *B. hyperboreus*, *B. polaris* y *B. zonatus*) se clasificaron como EN o VU bajo este criterio. Por lo tanto, para controlar este efecto, también se probó la influencia del área geográfica en el estado de declinación, excluyendo estas cinco especies de las regresiones logísticas. Además, se comparó el tamaño del área histórica, para estas cinco especies en declinación con el de las 35 especies declinantes restantes clasificadas bajo otros criterios.

Se obtuvieron datos sobre la longitud de la lengua y las infecciones de parásitos internos, de la literatura (Tabla S1). La longitud de la lengua (en mm) se definió como la suma de la glosa y prementum (Harder 1985), calculando el promedio cuando se dispuso de valores múltiples para una misma especie. Los datos sobre la infección con parásitos internos *Crithidia bombi*, *Nosema* sp. o *Locustacarus buchneri* se codificaron como una variable binaria, con presencia de infección parasitaria codificada como 1 y ausencia codificada como 0. Se evaluó el efecto de cada parásito (*Crithidia bombi*, *Nosema* sp., o *Locustacarus buchneri*) por separado, y también el efecto de llevar cualquiera de estos parásitos internos (al menos uno), independientemente de la identidad del parásito. Para este último caso, los datos se combinaron en una variable binaria adicional (es decir, presencia de parásitos), codificándose como 0 cuando ninguna de las tres especies de

parásitos fue encontrada y como 1 cuando al menos una de las tres especies de parásitos fue detectada. Para reducir los falsos negativos asociados con tamaños de muestra extremadamente bajos, la ausencia de parásitos se consideró sólo en especies en las que al menos cinco individuos fueron evaluados para la infección.

A pesar del esfuerzo para recopilar la mayor información posible, los datos disponibles a nivel de especie, fueron diferentes para los distintos factores que se evaluaron, dando lugar a variaciones en el tamaño de la muestra de los análisis. De las 115 especies para las cuales el estatus de declinación estaba bien establecido, se recopiló una base de datos de 111 de especies con relaciones filogenéticas conocidas (Cameron et al. 2007; Hines 2008). Estas especies pertenecían a 14 de 15 subgéneros aceptados (Tabla S1). Se obtuvieron datos de tamaño del rango para 257 especies, de la longitud de la lengua para 91 especies, mientras que de presencia de *Crithidia bombi*, *Nosema sp.* y *Locustacarus buchneri*, y de al menos uno de estos tres parásitos, los datos estaban disponibles para 49, 77, 52 y 106 especies respectivamente. Sin embargo, dado que no todas estas especies fueron incluidas en la filogenia, el tamaño de la muestra para las evaluaciones de la señal filogenética se basó en el tamaño de las muestras presentadas en la Tabla 1.

La señal filogenética y el papel de los predictores de declinación propuestos

Se estimó la señal filogenética de la declinación, así como la de los rasgos de la especie incluidos como predictores, utilizando dos métodos alternativos, dependiendo de la naturaleza de la variable. Para los rasgos de variación continua (área geográfica y longitud de la lengua), se estimó la magnitud de la señal filogenética con el índice K de Blomberg (Blomberg et al. 2003), utilizando la función *phylosig* del paquete R *phytools* (Revell 2012). El índice K de Blomberg cuantifica la magnitud de la señal filogenética en los datos relativos a un modelo de movimiento browniano de evolución de rasgos, de modo que $K = 1$ corresponde a un patrón de movimiento browniano y $K = 0$ corresponde a una distribución aleatoria del rasgo a través de la filogenia. Se

evaluó la significancia de la señal filogenética (o sea la desviación de una distribución aleatoria) mediante la asignación al azar de valores de los terminales (tips) y la generación de una distribución nula de 10.000 valores K , a partir de la cual se pudo estimar un p asociada a la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo que el observado por azar.

Por otro lado, se cuantificó la señal filogenética en variables binarias (para el estado de declinación y la presencia de parásitos) con el estadístico D (Fritz & Purvis 2010), que es una suma escalada de las diferencias entre clados hermanos en el estado de un rasgo binario. Si los rasgos están filogenéticamente agrupados el valor de $D = 0$ (por ejemplo, el modelo de umbral Browniano, ver Fritz & Purvis 2010), si D es negativo, los rasgos están extremadamente conservados más allá de lo esperado por azar, mientras que en rasgos distribuidos al azar $D = 1$, e incluso puede ser mayor a uno cuando los rasgos están sobre-dispersados a través de la filogenia (i.e. especies hermanas tienen valores dispares de la variable binaria).

Se compararon los valores de las distribuciones de D observados con aquellos resultantes del azar ($D=1$), así como de un agrupamiento total ($D=0$). Se utilizó la función *phylo.d* del paquete *caper* de R (Orme 2012) para generar y graficar 1000 simulaciones del estadístico D y las distribuciones nulas. Para comparar la magnitud de la señal filogenética entre rasgos continuos y binarios, los valores de D se transformaron como: $K^* = 1-D$, de modo que $K^* = 0$ indica una falta de señal, mientras que $K^* = 1$ indica una cantidad de señal comparable a la esperada bajo un modelo de evolución del rasgo de tipo browniano (ver Goberna & Verdú 2015). Se evaluó la sensibilidad de la estimación de la señal filogenética debida al muestreo incompleto en los datos de declinación, mediante el re-muestreo de 1000 veces al azar, de un número dado de especies de abejorros, que van de 20 a 110 de todo el grupo de 111 especies (ver más adelante) y recalculando D para cada conjunto de datos aleatoriamente muestreado.

Se calculó la proporción de especies declinando para cada subgénero junto con su error estándar (es decir, $\sqrt{[p(1-p)/n]}$). Luego, se comparó gráficamente la proporción de especies que declinan por subgénero con la proporción global de especies declinando para todo el género. Se identificaron subgéneros vulnerables (o estables) particulares basados en si

la proporción total de abejorros en declinación estaba o no incluida en el rango de valores delimitado por la proporción media ± 1 error estándar para cada subgénero. Además, se utilizó la prueba binomial (Crawley 2007) para comparar la proporción global de especies en declinación con la proporción de especies en declinación en *Thoracombombus* y *Pyrobombus* ambos subgéneros con un número de especies suficiente para generar una aproximación de Chi-cuadrado confiable.

Por último, se evaluaron las hipótesis de cambio climático, pérdida de recursos florales y enfermedades como causas de la declinación, mediante la ejecución de regresiones logísticas filogenéticamente controladas (Ives & Garland 2010). Estas regresiones evaluaron específicamente la influencia del tamaño del área geográfica de la especie, la longitud de la lengua y la presencia de patógenos internos: *Crithidia bombi*, *Nosema* sp., *Locustacarus buchneri*, o al menos uno de ellos, en el estado de declinación de la especie, es decir si la especie está declinando o no. Se realizaron regresiones filogenéticas utilizando la función *phyloglm* del paquete *phylolm* implementado en R (Ho & Ané 2014) con pruebas separadas para cada uno de estos predictores. Sin embargo, los predictores que mostraron un efecto significativo en la declinación cuando se evaluaron por separado, también se probaron simultáneamente para evaluar el efecto independiente de cada uno de ellos (ver la sección de Resultados).

RESULTADOS

Tendencias globales

El riesgo de extinción de 115 (44%) de las ~260 especies conocidas de *Bombus* ha sido evaluado ya sea a escala global (N = 56) o continental (N = 49). Entre éstas, 40 especies (34,7%) fueron clasificadas como “en declinación”. Del mismo modo, 38 especies (34,2%) de las 111 especies con estado de conservación conocido e incluidas en la filogenia de *Bombus*, están declinando. Por lo tanto, más de un tercio de la fauna global de abejorros evaluada, está amenazada.

La señal filogenética y el papel de los predictores de declinación propuestos

Las especies que declinan no se encontraron distribuidas aleatoriamente en la filogenia de *Bombus* (Figura 2). La magnitud de la señal filogenética asociada con la declinación de las especies (estimada como D o K^*) fue significativamente diferente que la esperada por el azar (Tabla 1). Aunque esta señal implica una propensión de ciertos linajes a la declinación, la misma fue menos “contagiosa” o agregada de lo esperado en base a un modelo browniano de evolución de caracteres (Figura S1).

Aunque el estado de declinación no estaba disponible para todas las especies dentro de cada género y la filogenia analizada no incluía todas las especies de abejorros conocidas, el análisis de sensibilidad mostró que el tamaño de muestra fue lo suficientemente grande como para proporcionar una estimación robusta de la señal filogenética en el patrón de declinación. Un subconjunto de 80-90% de las especies incluidas en el análisis habría sido suficiente para detectar el patrón con el mismo grado de certidumbre (Figura S2).

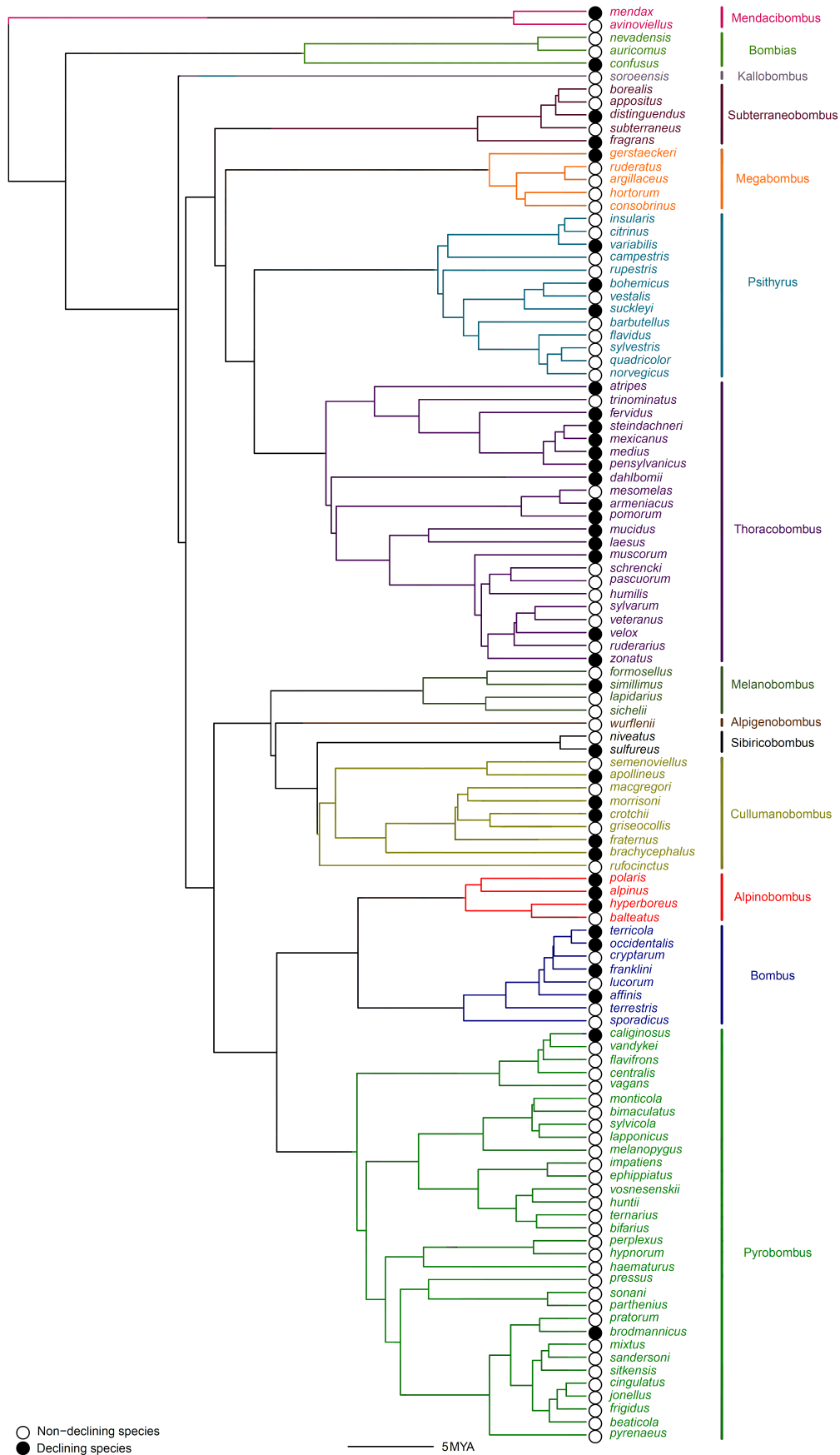


Figura 2: Relaciones filogenéticas entre especies de *Bombus* y su estatus de declinación (codificada de forma binaria) para cada especie. La topología y los tiempos de divergencia fueron extraídos de Cameron y col. (2007) y Hines (2008). Se muestran las especies que declinan (círculos negros) y las que no declinan (círculos blancos). Los subgéneros están indicados con diferentes colores.

La señal filogenética que encontré en la declinación estuvo asociada con una distribución desigual de las especies en declinación entre los subgéneros. La Figura 3 muestra que las proporciones de especies que declinan dentro de los subgéneros *Alpinobombus*, *Thoracobombus* y *Cullumanobombus* fueron más altas comparadas a la proporción de especies que declinan en todo el género. Por el contrario, *Pyrobombus* mostró la menor proporción de especies en declinación. Las pruebas estadísticas confirmaron que la proporción de especies que declinan en *Thoracobombus* y *Pyrobombus* fueron significativamente mayores ($X^2 = 5,49$, $p = 0,019$) y menores ($X^2 = 8,32$, $p = 0,004$) respectivamente, que la proporción de las que declinan en total.

	Magnitud de la señal filogenética (K or K*)	valor de p	N
Declinación	0,41	0,004	111
Tamaño del área geográfica	0,20	0,004	199
Longitud de la lengua	0,71	<0,001	89
Presencia de parásitos	0,31	0,033	106
Presencia de <i>C. bombi</i>	0,29	0,193	49
Presencia de <i>Nosema</i> sp.	0,27	0,113	77
Presencia de <i>L. buchneri</i>	0,04	0,437	51

Tabla 1: Magnitud de la señal filogenética en los patrones de declinación de *Bombus* y en los predictores de la declinación. Los valores de K y K* cuantifican la señal filogenética en las variables cuantitativas y binarias respectivamente (ver métodos para los detalles). Los datos para el largo de la lengua y el rango total fueron \log_{10} transformados. N= número de muestras; p= valores de p bajo la hipótesis nula de ausencia de señal filogenética.

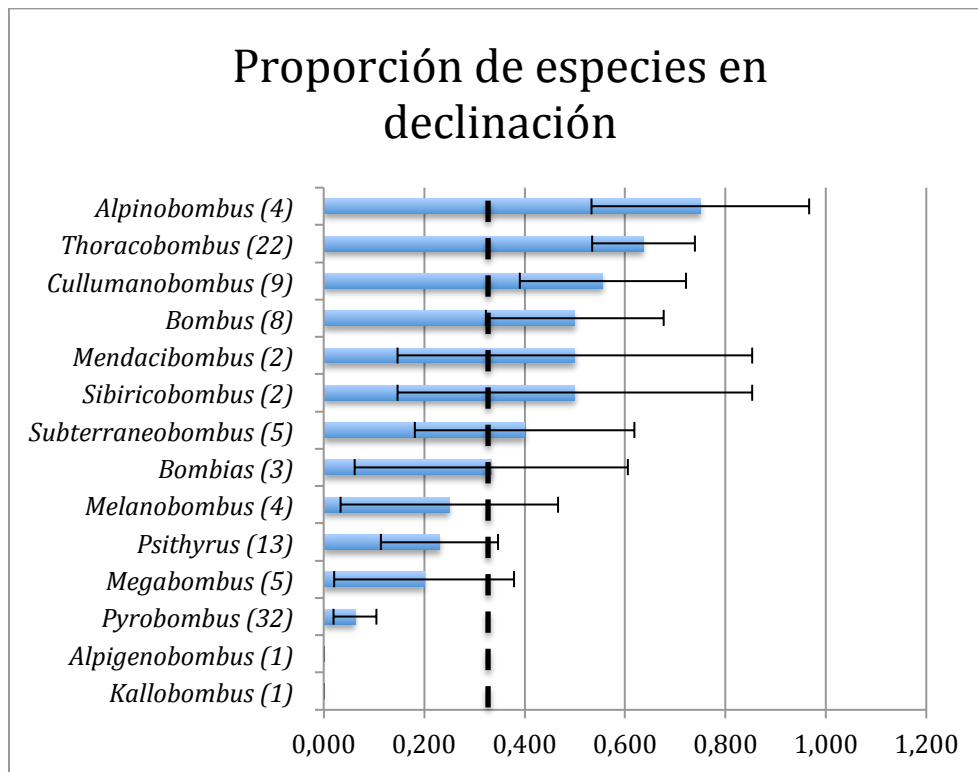


Figura 3: Proporción de especies que declinan en cada subgénero. Las barras de error representan el error estándar de la proporción. La línea vertical, representa la proporción media de especies en declinación para todo el género. El número de especies analizadas está indicado entre paréntesis. El subgénero *Orientalibombus* no fue incluido por la ausencia total de información en el estatus de conservación para al menos una de sus especies.

Algunos de los predictores propuestos de la declinación de abejorros también mostraron una distribución no aleatoria en la filogenia de *Bombus*. El tamaño del área geográfica, la longitud de la lengua y la presencia de al menos uno de los parásitos evaluados mostraron señales filogenéticas significativas. Sin embargo, no se encontró señal filogenética en la presencia de *C. bombi*, *Nosema sp.* o *L. buchneri* por separado, lo cual podría estar relacionado con un tamaño de muestra pequeño (Tabla 1).

La declinación de las especies se relacionó significativamente con el tamaño del área geográfica, siendo las especies con áreas más pequeñas más propensas a declinar. Inesperadamente, las especies en las que no se han reportado parásitos internos fueron también más propensas a declinar. Sin embargo, la probabilidad de declinación no se relacionó significativamente con la presencia de parásitos cuando se realizaron análisis para cada especie de parásito por separado (Tabla 2).

	Estimador (Error estándar)	valor de p	N
Tamaño del area geográfica	-1,097 (0,440)	0,012	111
Longitud de lengua	3,162 (3,372)	0,348	69
Presencia de parásitos	-1,947 (0,625)	0,002	77
Presencia de <i>C. bombi</i>	-0,0004 (0,7955)	0,999	49
Presencia de <i>Nosema</i> sp.	-1,168 (0,680)	0,080	62
Presencia de <i>L. buchneri</i>	-0,545 (0,847)	0,520	45

Tabla 2: Regresiones logísticas simples para los parámetros estimados del efecto del rango del hábitat, la longitud de la lengua o la infección con parásitos internos en el estatus de declinación. N= tamaño de muestra. En negrita los valores estadísticamente significativos.

La correlación positiva entre estos dos predictores, tamaño del área y presencia de parásitos, si bien fue significativa fue débil (Tau = 0,195, $p = 0,046$, Tabla S2). Sin embargo, el efecto de la presencia de parásitos siguió siendo significativa en la regresión logística múltiple controlada filogenéticamente donde se incluyeron ambos factores (estimación de la incidencia de parásitos = -1,633, SE = 0,631, $p < 0,05$). A pesar de que el efecto del tamaño del área se volvió no significativo en esta regresión múltiple (estimación = -1,343, SE = 0,57, $p = 0,117$), esto puede atribuirse en parte a una reducción en el tamaño de la muestra (de 111 incluidos en la regresión simple a 77 especies en la regresión múltiple) ya que los coeficientes de regresión estimados para este factor se fueron similares en estos dos análisis (es decir, -1,097 vs. -1,343 para las regresiones simple y múltiple, respectivamente). Además, el efecto del tamaño del área de distribución en la declinación no fue influenciado por la inclusión de especies con declinación clasificadas según los criterios de la Lista Roja de la UICN que implican cambios en el rango geográfico (es decir, las cinco especies mencionadas con anterioridad). Las regresiones logísticas simples filogenéticas excluyendo estas cinco especies revelaron un efecto negativo todavía significativo del tamaño total del área en el estado de declinación (coeficiente = -1,14 SE = 0,456, $P = 0,0125$). Por otra parte el tamaño del área geográfica basado en registros históricos de estas cinco especies, no fue más estrecho

que el tamaño de rango de otras especies en declinación (prueba de Wilcoxon, $W = 55,5$, $p = 0,599$). Por último, la probabilidad de declinación no se relacionó significativamente con la longitud de la lengua (Tabla 2).

DISCUSIÓN:

Los polinizadores están declinando en todo el mundo (Potts et al. 2016), y los abejorros no son una excepción. Hasta la fecha se ha evaluado el 44% de la fauna conocida de abejorros para determinar su riesgo de extinción, ya sea a escala global o continental. De ellos, este trabajo muestra que alrededor de un tercio de las especies de abejorros estaría declinando. Los resultados mostraron que las especies en declinación no están distribuidas aleatoriamente en la filogenia de *Bombus*, lo que sugiere la existencia de diferencias entre los clados en la susceptibilidad a la declinación. También sugieren que podría haber rasgos evolutivamente conservados subyacentes asociados con esta susceptibilidad diferencial. Dos factores mostraron estar asociados con la declinación de las especies de abejorros luego de tener en cuenta la estructura filogenética. Primero, las especies que ocupan áreas geográficas más pequeñas fueron más propensas a declinar, una predicción consistente con las hipótesis del cambio climático o pérdida del hábitat como factores de declinación de las especies con rangos geográficos más estrechos (Williams et al. 2007; Williams et al. 2009; Williams & Osborne 2009). En segundo lugar, en contraste con las expectativas anteriores, la susceptibilidad a la declinación aumentó en aquellas especies donde los patógenos internos no fueron detectados.

La señal filogenética significativa, aunque moderada, en el estado de declinación de las especies, parece estar vinculada a las diferencias en la susceptibilidad entre los distintos subgéneros. Aunque el análisis de la señal filogenética se realizó en una muestra que representaba el 44% de todas las especies de *Bombus*, un análisis de sensibilidad basado en simulaciones mostró que los resultados fueron robustos a las limitaciones de tamaño de la muestra y no dependían de la inclusión o exclusión de ninguna especie particular (Figura S2).

Específicamente, las especies en declinación estaban sobrerrepresentadas en el subgénero *Thoracobombus*, *Cullumanobombus* y *Alpinobombus*, aunque el bajo número de especies en los dos subgéneros posteriores no permite sacar conclusiones confiables a nivel de subgénero. Dentro de *Thoracobombus* casi dos tercios de las especies están declinando globalmente o regionalmente (Figura 3). Por otra parte, seis de las ocho especies, clasificadas como "de menor preocupación" por la evaluación de especies de la Unión Europea - UICN y, por lo tanto, clasificadas como "no declina" en este estudio, informan una tendencia a la declinación de sus poblaciones, aunque no califican para ser categorizadas como amenazadas aún. Esto sugiere que el número de especies que declinan en este subgénero podría aumentar en el futuro si estas tendencias decrecientes de la población continúan. De hecho, aunque la especie *B. rubriventris* del subgénero *Thoracobombus* ha sido evaluado como "críticamente en peligro de extinción", puede que esta especie esté posiblemente extinta (Williams 2015), lo que representaría la primera extinción de una especie de abejorro que se registra en tiempos históricos. Por lo tanto, se deben realizar más esfuerzos de investigación para comprender las causas más cercanas de la declinación de las especies de este subgénero y definir medidas que deben tomarse para mitigar su declinación. Por el contrario, las especies pertenecientes al subgénero *Pyrobombus* fueron menos propensas a la declinación en comparación con la proporción global para el género (Figura 3). Por último, la cantidad de especies evaluadas dentro de la mayoría de los subgéneros fueron insuficientes para establecer cualquier tendencia ya que el estatus de la mayoría de las especies de abejorros todavía no ha sido evaluado. Esto es particularmente mayor en Asia que alberga más de la mitad de la fauna mundial de abejorros, donde aún se siguen descubriendo nuevas especies (Williams et al. 2016), y donde faltan la mayoría de las evaluaciones de riesgo. Sin embargo, el análisis que conduje no debería tener ningún sesgo taxonómico importante ya que el mismo incluyó representantes de 14 de los 15 subgéneros actualmente reconocidos de *Bombus* y 111 de las ~ 260 especies conocidas de abejorros.

La estructuración filogenética en patrones de declinación sugiere una asociación entre la susceptibilidad a la extinción y los rasgos compartidos por

miembros pertenecientes al mismo linaje. Estos rasgos no parecen estar estructurados geográficamente, ya que no se ha encontrado evidencia alguna de que la probabilidad de declinación en ciertos subgéneros esté relacionada con la distribución geográfica de una especie. Por ejemplo, los dos subgéneros más vulnerables, *Thoracobombus* y *Cullumanobombus*, están ampliamente distribuidos a través del Viejo y Nuevo Mundo. Además, *Pyrobombus*, el subgénero menos susceptible, se distribuye tanto en Eurasia como en Norteamérica, al igual que *Alpinobombus*, otro subgénero susceptible de declinar. De todas formas, un análisis formal de los patrones geográficos de declinación sería necesario para confirmar esta aparente falta de estructura espacial.

Alternativamente, los rasgos que aumentan o disminuyen la probabilidad de declinación en diferentes linajes podrían estar asociados con la edad del clado. Por ejemplo, los clados más recientes podrían mostrar novedades evolutivas que les permitan adaptarse mejor a las condiciones actuales. Aunque esto no se evaluó formalmente aquí, tal tendencia no fue evidente en este conjunto de datos (edad estimada en Hines 2008) al comparar la edad de los clados con los patrones de declinación. Los subgéneros predominantemente en declinación están incluidos tanto en linajes "antiguos" (por ejemplo, *Cullumanobombus* y *Thoracobombus*, de aproximadamente 16 MY), como "jóvenes" (por ejemplo, *Alpinobombus*, edades alrededor de 7 MY), mientras que lo mismo ocurre dentro de subgéneros catalogados como no declinantes (*Pyrobombus*, con 13,2 MY y *Psithyrus*, de 9 MY de edad). Por otra parte, vale la pena hacer notar que *Pyrobombus*, un clado con especies predominantemente "no declina" y el subgénero hermano *Bombus s.s* y *Alpinobombus*, ambos predominantemente "declina", son clados filogenéticamente cercanos y tienen edades similares (Figura 2). En consecuencia, a primera vista, pareciera no haber una correlación evidente entre la edad del clado y el estado de declinación. El hecho de que los efectos de estos predictores de declinación sigan siendo fuertemente significativos después de tener en cuenta la estructura filogenética, sugieren que otros rasgos conservados podrían explicar la susceptibilidad diferencial de declinación entre los subgéneros, aunque el tamaño del área de distribución y la presencia de parásitos tengan una fuerte señal filogenética.

Este estudio revela un fuerte efecto del rango geográfico en el estado de declinación (Tabla 2) al encontrar que las especies de abejorros con rangos más estrechos fueron particularmente vulnerables, un patrón que ha sido descrito con anterioridad para otros taxa (Purvis et al. 2000; Cardillo et al. 2005; Bielby et al. 2008). La amplia distribución de las especies puede asociarse a menudo con grandes tamaños de poblaciones y adaptaciones a diferentes entornos (Williams et al. 2007; Williams et al. 2009). En consecuencia, estas especies podrían ser más resilientes a impactos relacionados al cambio en el uso de la tierra y la pérdida de hábitat (Williams & Osborne 2009). Por otro lado, las especies con rangos estrechos pueden ser especialistas no sólo en términos de características del sitio sino también en términos de las condiciones climáticas en las que pueden habitar (Stevens 1992). Este resultado es consistente con los hallazgos de Williams y col. (2009), quienes encontraron que la susceptibilidad a la declinación de las especies de abejorros en tres continentes diferentes estaba en parte relacionada con la estrecha especialización climática. Un estudio reciente en el hemisferio norte revela pérdidas severas de tamaño del área geográfica en los límites del sur de las especies y una falta de respuesta al ajuste de las condiciones de calentamiento observada en los límites septentrionales, tanto en Europa como en Norteamérica (Kerr et al. 2015). En consonancia con estos antecedentes, mis resultados encienden una alarma para las especies con áreas geográficas más pequeños, que pueden ser más susceptibles a la declinación, ya que se espera que el calentamiento global reduzca aún más el tamaño del mismo.

Por otro lado, la longitud de la lengua se ha considerado en gran medida como un proxy de la especialización trófica (pero véase Rasmont et al. 2015), y este último factor ha sido relacionado con la declinación de las especies de abejorros (Bommarco et al. 2012), debido a la falta de alimento por la baja disponibilidad de flores de morfologías complejas (Goulson & Darvill 2004; Goulson et al. 2005; Goulson et al. 2008). Aunque la longitud de la lengua mostró una estructura filogenética fuerte, como fue encontrado con anterioridad (Harmon-Threatt & Ackerly 2013; Pellissier et al. 2013), este rasgo altamente conservado no estuvo significativamente relacionado con la declinación de las especies de acuerdo con este análisis. En consecuencia,

aunque este factor puede desempeñar un papel en la especialización trófica (Goulson & Darvill 2004) e indirectamente en la rareza de especies a escala local (Goulson et al. 2008b), este estudio no apoya la hipótesis de un papel significativo de este rasgo en la explicación de los patrones globales de declinación de abejorros. Sumado a eso, un estudio muy interesante de Miller-Struttman y col. (2015), muestran una rápida evolución en el tamaño de la longitud de la lengua (para dos especies), al comparar la longitud de lengua en tiempo histórico vs la actual (en 40 años) y encuentran que ha habido un acortamiento de la lengua en un 24,4%. Esta posibilidad de rápido cambio, es la que quizás permita a algunas especies de lenguas largas adaptarse al actual cambio global. Las dos especies utilizadas en ese estudio (*Bombus balteatus* y *B. sylvicola*) están clasificadas como de lengua larga y no están declinando. Entonces surgen preguntas para seguir investigando: esta capacidad de adaptación, ¿tendrá una base genética? ¿estará más representada en ciertos clados?.

La susceptibilidad a la declinación aumentó en aquellas especies en donde no se han reportado patógenos internos, un resultado inesperado, en función de las hipótesis más frecuentemente encontradas en la literatura que relacionan la creciente susceptibilidad de patógenos con la creciente declinación y que contrasta con las evidencias previas. (Cameron et al. 2011). A partir de las comparaciones entre las distribuciones históricas y actuales, y la prevalencia actual de la infección de microsporidios (porcentaje de individuos infectados) en ocho especies de la fauna de abejorros norteamericanos, Cameron y cols. (Cameron et al. 2011) mostraron una mayor prevalencia de *Nosema bombi* en especies declinantes que en comparación con especies estables. Sin embargo, la hipótesis de los patógenos como promotores de la declinación debe evaluarse con precaución, ya que se predicen relaciones negativas o positivas entre la presencia de patógenos y disminuciones de abejorros dependiendo de si la tolerancia (es decir, la capacidad del huésped de lidiar con una determinada carga de parásitos) o la resistencia (capacidad para reducir el establecimiento de parásitos) son el mecanismo que explica por qué algunas especies sean afectadas por patógenos y otras no (o al menos no tanto). Los resultados reportados en este capítulo son consistentes con una hipótesis de tolerancia

a estos parásitos y no de resistencia, sugiriendo que las especies estables parecen ser capaces de llevar a los parásitos internos sin una disminución en la aptitud significativa (o al menos no letal). En el Capítulo 4 de esta tesis, muestro como la prevalencia del protozoo patógeno *Apicystis bombi* co-introducido junto con *Bombus terrestris* fue mucho más alta en las especies invasoras y en expansión que en el abejorro nativo en declinación, *Bombus dahlbomii* (Arbetman et al. 2013). Los patógenos que son altamente letales en los nuevos huéspedes podrían actuar como filtros ecológicos fuertes y, por lo tanto, los individuos, las colonias y las poblaciones que sobreviven estarían libres de patógenos, con lo cual se reduce la posibilidad de detectar estos parásitos en poblaciones silvestres. Los efectos de muestreo también podrían mediar esta asociación. En aquellas especies menos tolerantes a estos patógenos, los individuos infectados tendrían una supervivencia reducida, entonces el número de individuos necesarios para detectar la enfermedad debería ser mayor que en las especies más tolerantes. Por otra parte, el número de individuos muestreados para estas evaluaciones podría ser menor en las especies en declinación en comparación a las que no declinan, ya sea porque son más difíciles de encontrar o por razones de conservación, reduciendo así aún más la posibilidad de detectar patógenos en estas especies en declinación.

Los patrones de declinación de *Bombus* han sido frecuentemente reportados a escala regional, pero este es el primer análisis global controlado filogenéticamente realizado en este género. En cualquier caso, los resultados que aquí se presentan deben tomarse con cautela, no sólo por la falta de información sobre el estatus de declinación de algunas especies, más concretamente, la gran fauna asiática de abejorros, sino también porque la declinación es un proceso dinámico del cual aquí se presenta una “instantánea”. Sin embargo, el robusto patrón filogenético contagioso de declinación que se reporta aquí implica que la historia evolutiva de abejorros y su diversidad genética asociada podrían verse profundamente erosionadas si las especies en declinación se extinguiesen. Además, se encontró que las especies que ocupan tamaños más estrechos son más propensas a declinar en todo el mundo, algo que ya se informó para un grupo diverso de especies (Purvis et al. 2000; Cardillo et al. 2005; Bielby et al. 2008), pero no para los

abejorros a nivel mundial. De manera inesperada, se encontró que las especies que albergan alguno de los tres parásitos internos comunes de *Bombus* fueron menos propensos a declinar que aquellos en los que ninguno de estos patógenos ha sido reportado. Sin embargo, este patrón podría indicar una alta tolerancia en lugar de alta resistencia en las especies estables, y baja tolerancia en lugar de baja resistencia a la infección en especies en declinación. Sin duda, se necesitan más estudios para desentrañar el significado de esta asociación. Dado que la co-introducción de patógenos ha sido señalada como una causa de declinación de especies a nivel local y regional (Cap. 4), resulta prioritario explorar más en profundidad el papel de la tolerancia de las especies de abejorros a patógenos comunes así como a nuevas enfermedades emergentes. Puesto que el estado de muchas de las especies del género *Bombus* aún no se ha evaluado a lo largo de toda su distribución global, pero los factores que afectan a las especies de abejorros siguen actuando, los esfuerzos de conservación deben dirigirse especialmente a las especies pertenecientes a clados susceptibles y/o que habitan áreas estrechas.

REFERENCIAS

- Aizen, M.A. & Harder, L.D., 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current biology*, 19(11), p.915–918.
- Arbetman, M.P. et al., 2013. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biological Invasions*, 15(3), pp.489–494.
- Bartomeus, I. et al., 2013. Historical changes in northeastern US bee pollinators related to shared ecological traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), pp.4656–60.
- Bielby, J., Cooper, N. & Cunningham, A., 2008. Predicting susceptibility to future declines in the world's frogs. *Conservation Letters*, 1(2), pp.82–90.
- Biesmeijer, J.C. et al., 2006. Parallel Declines in Pollinators and Plants. *Science*, 313(July), pp.351–354.
- Blomberg, S.P., Garland, T. & Ives, A.R., 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), pp.717–745.
- Bommarco, R. et al., 2012. Drastic historic shifts in bumble-bee community composition in Sweden. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1727), pp.309–15.
- Cameron, S.A. et al., 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp.1–6.
- Cameron, S.A., Hines, H.M. & Williams, P.H., 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(1), pp.161–188.
- Cardillo, M. et al., 2005. Multiple causes of high extinction risk in large mammal species. *Science*, 309(5738), pp.1239–1241.
- Colla, S.R. et al., 2012. Assessing declines of North American bumble bees (*Bombus* spp.) using museum specimens. *Biodiversity and Conservation*, 21(14), pp.3585–3595.

- Crawley, M.J., 2007. *The R book* U. K. Imperial College London at Silwood Park, ed., Wiley.
- Fitzpatrick, Ú. et al., 2007. Rarity and decline in bumblebees – A test of causes and correlates in the Irish fauna. *Biological Conservation*, 136(2), pp.185–194.
- Fritz, S.A. & Purvis, A., 2010. Selectivity in mammalian extinction risk and threat types: A new measure of phylogenetic signal strength in binary traits. *Conservation Biology*, 24(4), pp.1042–1051.
- Garibaldi, L.A. et al., 2014. From research to action: Enhancing crop yield through wild pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(8), pp.439–447.
- Garibaldi, L.A. et al., 2011. Global growth and stability of agricultural yield decrease with pollinator dependence. *Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), pp.5909–14.
- Garibaldi, L.A. et al., 2013. Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. *Science*, 339(6127).
- Goberna, M. & Verdú, M., 2015. Predicting microbial traits with phylogenies. *The ISME journal*, 10, pp.959–967.
- Goulson, D. & Darvill, B., 2004. Niche overlap and diet breadth in bumblebees; are rare species more specialized in their choice of flowers? *Apidologie*, 35(1), pp.55–63.
- Goulson, D. et al., 2005. Causes of rarity in bumblebees. *Biological Conservation*, 122(1), pp.1–8.
- Goulson, D., Lye, G.C. & Darvill, B., 2008a. Diet breadth, coexistence and rarity in bumblebees. *Biodiversity and Conservation*, 17(13), pp.3269–3288.
- Goulson, D., Lye, G.C.C. & Darvill, B., 2008b. Decline and Conservation of Bumble Bees. *Annual Review of Entomology*, 53(1), pp.191–208.
- Graystock, P. et al., 2013. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology*, 50(5), pp.1207–1215.
- Harmon-Threatt, A.N. & Ackerly, D.D., 2013. Filtering across spatial scales: phylogeny, biogeography and community structure in bumble bees. *PloS one*, 8(3), p.e60446.

- Hatfield, R. et al., 2015. IUCN Assessments for North American *Bombus* spp.,
- Heinrich, B., 1975. Thermoregulation in bumblebees. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 96(2), pp.155–166.
- Hines, H.M., 2008. Historical biogeography, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Systematic biology*, 57(1), pp.58–75.
- Ho, L. & Ané, C., 2014. Intrinsic inference difficulties for trait evolution with Ornstein-Uhlenbeck models. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(11), pp.1133–1146.
- Imhoof, B. & Schmid-Hempel, P., 1999. Colony success of the bumble bee, *Bombus terrestris*, in relation to infections by two protozoan parasites, *Crithidia bombi* and *Nosema bombi*. *Insectes Sociaux*, 46(3), pp.233–238.
- Ives, A.R. & Garland, T.J., 2010. Phylogenetic logistic regression for binary dependent variables. *Systematic biology*, 59(1), pp.9–26.
- Kerr, J.T. et al., 2015. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science*, 349(6244), pp.177–180.
- Kevan, P.G. & Viana, B.F., 2003. The global decline of pollination services. *Biodiversity*, 4(4), pp.3–8.
- Kissinger, C.N. et al., 2011. Survey of bumble bee (*Bombus*) pathogens and parasites in Illinois and selected areas of northern California and southern Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107(3), pp.220–224.
- Klein, A.-M. et al., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 274(1608), pp.303–13.
- Kosior, A. et al., 2007. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. *Oryx*, 41(1), p.79.
- Maloof, J.E. & Inouye, D.W., 2000. Are nectar robbers cheaters or mutualists? *Ecology*.
- Meeus, I. et al., 2011. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Conservation Biology*, 25(4), pp.662–671.

- Michener, C.D., 2007. *The Bees of the World*. 2nd,
- Miller-Struttman, N.E. et al., 2015. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science*, 78(2010), pp.75–78.
- Morales, C.L. et al., 2013. Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(10), pp.529–534.
- Nieto, A. et al., 2014. European Red List of bees., Luxembourg.
- Ollerton, J., Winfree, R. & Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), pp.321–326.
- Orme, D., 2012. The Caper package: comparative analysis of phylogenetics and evolution in R.
- Otterstatter, M.C. et al., 2005. Effects of parasitic mites and protozoa on the flower constancy and foraging rate of bumble bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58(4), pp.383–389.
- Parmesan, C., 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*.
- Pellissier, L. et al., 2013. Phylogenetic relatedness and proboscis length contribute to structuring bumblebee communities in the extremes of abiotic and biotic gradients A. Baselga, ed. *Global Ecology and*, 22(5), pp.577–585.
- Potts, S.G. et al., 2016. IPBES: Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production.
- Potts, S.G. et al., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), pp.345–353.
- Purvis, A. et al., 2000. Predicting extinction risk in declining species. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 267, pp.1947–1952.
- Rasmont, P. et al., 2015. Climatic risk and distribution atlas of European bumblebees. *BioRisk*.
- Revell, L.J., 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3(2), pp.217–223.

- Rutrecht, S.T. & Brown, M.J.F., 2008. The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens. *International Journal for Parasitology*, 38(7), pp.799–808.
- Sárospataki, M., Novák, J. & Molnár, V., 2005. Assessing the threatened status of bumble bee species (Hymenoptera: Apidae) in Hungary, Central Europe. *Biodiversity and Conservation*, 14(10), pp.2437–2446.
- Schmid-Hempel, R. et al., 2014. The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *The Journal of animal ecology*, 83(4), pp.823–837.
- Stevens, G.C., 1992. *The Elevational Gradient in Altitudinal Range: An Extension of Rapoport's Latitudinal Rule to Altitude*. The University of Chicago Press for The American Society of Naturalists, 140(No. 6),
- Williams, P.H. et al., 2008. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39(1), pp.46–74.
- Williams, P.H., 2015. *Bombus rubriventris* : type locality, different histories of bumblebees in the New World, and a likely invertebrate extinction. *Journal of Natural History*, 49(19–20), pp.1159–1171.
- Williams, P.H., 2005. Does specialization explain rarity and decline among British bumblebees? A response to Goulson et al. *Biological Conservation*, 122(1), pp.33–43.
- Williams, P.H., Araújo, M.B. & Rasmont, P., 2007. Can vulnerability among British bumblebee (*Bombus*) species be explained by niche position and breadth? *Biological Conservation*, 138(3–4), pp.493–505.
- Williams, P.H., Colla, S.R. & Xie, Z., 2009. Bumblebee vulnerability: common correlates of winners and losers across three continents. *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology*, 23(4), pp.931–40.
- Williams, P.H., Huang, J. & Jiandong, A., 2016. *Bear Wasps of the Middle Kingdom: A Decade of Discovering China's Bumble Bees*. Available at: <https://entomologytoday.org/2016/10/28/bear-wasps-of-the-middle-kingdom-a-decade-of-discovering-chinas-bumble-bees/>.
- Williams, P.H. & Osborne, J.L., 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40(3), pp.367–387.

Xie, Z., Williams, P.H. & Tang, Y., 2008. The effect of grazing on bumblebees in the high rangelands of the eastern Tibetan Plateau of Sichuan. *Journal of Insect Conservation*, 12(6), pp.695–703.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Subgéneros (total de especies)	Estatus de declinación	Área geográfica	Largo de lengua	Parásitos	C. <i>bombi</i>	N. <i>bombi</i>	L. <i>buchneri</i>
<i>Alpigenobombus</i> (8)	1	5	2	1	1	0	1
<i>Alpinobombus</i> (8)	4	5	2	2	1	1	1
<i>Bombias</i> (3)	3	3	3	3	2	3	1
<i>Bombus</i> (17)	8	11	9	7	5	7	7
<i>Cullumanobombus</i> (23)	9	19	4	3	2	3	3
<i>Kallobombus</i> (1)	1	1	1	1	1	1	1
<i>Megabombus</i> (23)	5	16	5	4	2	4	3
<i>Melanobombus</i> (18)	2	12	4	2	2	5	2
<i>Mendacibombus</i> (12)	1	6	2	0	0	1	0
<i>Orientalibombus</i> (3)	0	2	1	0	0	1	0
<i>Psithyrus</i> (27)	13	17	6	8	2	6	2
<i>Pyrobombus</i> (50)	32	43	25	24	21	25	17
<i>Sibiricobombus</i> (8)	2	5	0	1	0	2	0
<i>Subterraneobombus</i> (11)	5	8	5	4	2	4	2
<i>Thoracobombus</i> (52)	22	46	20	12	8	14	11
Total (264)	111	199	89	72	49	77	51

Tabla S1: Número de especies que poseen datos para cada una de las variables mostradas.

	Área total	Longitud de la lengua	Al menos un parásito	<i>C. bombi</i>	<i>Nosema</i> sp.	<i>L. buchneri</i>
Área total		-0.138	0.195**	0.45	0.097	0.400**
Longitud de la lengua	91		-0.143	-0.054	-0.259*	-0.138
Al menos un parásito	106	77		0.554**	0.847**	0.427**
<i>C. bombi</i> .	49	47	49		0.400**	0.038
<i>Nosema</i> sp.	77	59	77	42		0.345
<i>L. buchneri</i> .	45	45	51	40	37	

Tabla S2. Correlaciones pareadas entre los predictores de declinación en este estudio. Los valores mostrados en la parte superior de la diagonal, corresponden a los coeficientes de Pearson “r” cuando las dos variables son cuantitativas y a los coeficientes de Kendall-Tau cuando al menos una de las variables es binaria. Por debajo de la diagonal, se indica el número de las especies incluidas en cada asociación. Los valores de p se obtuvieron al realizar comparaciones con distribuciones nulas (10^4) generadas al azar; los datos significativos ($p < 0.05$) se indican en negrita. ** $p < 0.05$, * $p = 0.05$.

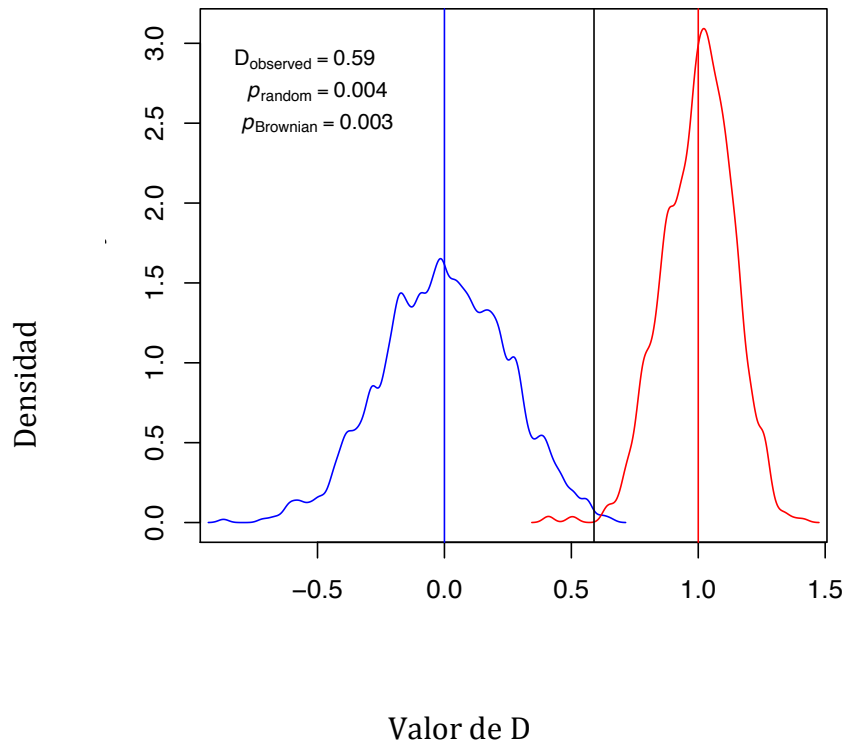


Figura S1: Valores de las señales filogenéticas nulas (D). En rojo la distribución al azar, en azul la distribución esperada siguiendo un modelo Browniano de evolución de los caracteres. Los patrones de los datos analizados de declinación generados con la función *phylo.d* del paquete de R *caper* (Orme et al 2013). La línea vertical negra muestra el valor de D observado, la cual se ubica casi completamente por fuera de la línea del azar, con lo cual indica señal filogenética en la declinación, significativamente distinta de lo esperado por azar.

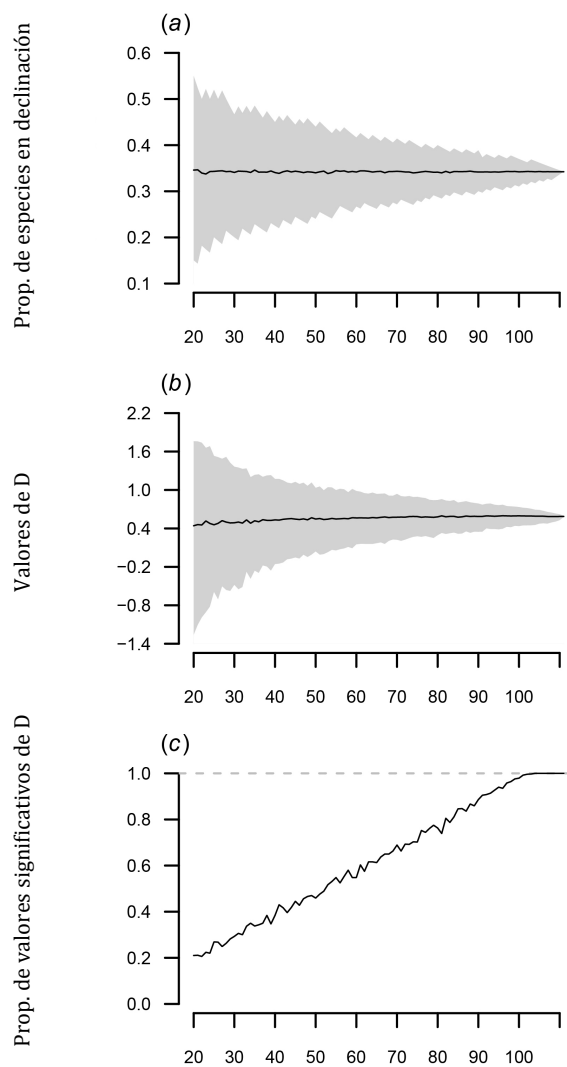


Figura S2. Análisis de sensibilidad al tamaño de muestra de abejorros, de la señal filogenética (valores de D) en la declinación. Las simulaciones fueron hechas re-muestreando 1000 veces al azar un número dado de especies (que fue de 20 hasta 110) de las 111 especies de abejorros para los cuales se obtuvo un estatus de declinación. a) proporción media de las especies en declinación (línea negra) y la región delimitada por los percentiles 2.5 y 97.5 de la distribución al azar (polígonos grises). b) valor promedio de D (línea negra) y la región delimitada por los percentiles 2.5 y 97.5 de la distribución al azar (polígonos grises). c) la proporción de valores de D que fueron significativamente <1 con un $\alpha = 0.05$.



CAPÍTULO 3

**REEMPLAZO ECOLÓGICO DE LA ESPECIE NATIVA *BOMBUS DAHLBOMII*
POR ESPECIES INTRODUCIDAS INVASORAS.**



RESUMEN

Existe una creciente preocupación en todo el mundo sobre los impactos que puedan generar las introducciones de especies del género *Bombus* no nativas (exóticas) sobre especies nativas. *Bombus ruderatus* y *B. terrestris* fueron introducidas secuencialmente en Chile, desde donde invadieron la región andino-patagónica de Argentina. El objetivo de este trabajo es evaluar a gran escala y a largo plazo, las consecuencias de tales introducciones. Aquí se revela que, a sólo 5 años de su llegada, la especie altamente invasiva *B. terrestris* se convirtió en la especie más abundante y extendida de *Bombus* en la región andino-patagónica, y su propagación coincide con la retracción geográfica de la única especie nativa, *Bombus dahlbomii*. Por otra parte, el seguimiento realizado a largo plazo de los ensambles de polinizadores de la especie endémica *Alstroemeria aurea* (amancay) en la Patagonia norte indica que, en 20 años, *B. ruderatus* y *B. terrestris* han reemplazado a *B. dahlbomii*, el cual era anteriormente el polinizador más abundante en el área y el principal polinizador del amancay. Este estudio muestra que los abejorros invasores pueden rápidamente extirpar congéneres nativos. Si bien los mecanismos subyacentes de la declinación del abejorro nativo siguen siendo desconocidos, la competencia por los recursos y la introducción de patógenos, no pueden descartarse.

INTRODUCCIÓN

Algunas especies de abejorros (*Bombus* spp.) han sido introducidas fuera de sus áreas de distribución natural y se han establecido en diversas regiones geográficas de muchos continentes (Velthuis & van Doorn 2006). El comercio mundial de colonias de abejorros para la polinización de cultivos, en particular de *Bombus terrestris*, genera especial preocupación por su demostrado potencial invasor y su impacto sobre especies de polinizadores nativos (Ings et al. 2005; Arbetman et al. 2013). Debido a que los *Bombus* nativos son ecológicamente más similares a los *Bombus* introducidos en comparación a otros polinizadores nativos (no *Bombus*), se espera que los abejorros nativos sean más vulnerables, entre otros impactos, a la potencial transmisión horizontal de enfermedades (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel 1993) y al desplazamiento competitivo (Ings et al. 2005) por parte de estos abejorros introducidos.

La Patagonia Andina, en el extremo sur de Sudamérica es una región con escasa riqueza de abejorros, la cual podría resultar particularmente susceptible a la invasión de otras especies de *Bombus*. La única especie nativa de este género, *Bombus dahlbomii* (Figura 1a), pertenece al subgénero *Thoracobombus* (Williams et al. 2008) el cual ha mostrado ser particularmente susceptible a la declinación (Capítulo 2). Esta especie grande y carismática habita en los bosques templados del sur de Argentina y Chile y juega un papel clave en las redes planta-polinizador en muchos tipos de bosques de la región (Aizen et al. 2002; Morales & Aizen 2002; Vázquez & Simberloff 2004; Ramos-Jiliberto et al. 2009). En el noroeste de la Patagonia en particular, *B. dahlbomii* interactúa estrechamente con la especie nativa y endémica "Amancay" (*Alstroemeria aurea*, Alstroemeriaceae); (Aizen 2001; Vázquez & Simberloff 2004), una liliacea silvestre, parental de híbridos cultivados y vendidos en florerías de todo el mundo (Figura 1b).



Figura 1: Sistema y especies en estudio. a) El abejorro nativo, *Bombus dahlbomii*, b) Detalle de la floración de amancay (*Alstroemeria aurea*) en el Valle del Challhuaco, c) las dos especies de abejorros invasores, hacia la izquierda *B. terrestris* y hacia la derecha *B. ruderatus*.

La región andino-patagónica de Argentina, ha sido secuencialmente invadida por las especies europeas *Bombus ruderatus* (Figura 1c, derecha) en el verano de 1993-94 (Roig-Alsina & Aizen 1996) y *B. terrestris* (Figura 1c, izquierda) en 2006 aproximadamente (Torretta et al. 2006), después de que ambos se introdujeron para polinizar cultivos en Chile. Reinas de la especie europea *B. ruderatus* provenientes de poblaciones previamente naturalizadas en Nueva Zelanda, fueron liberadas en las localidades de Cunco y Coipue, al sur de Temuco en 1982, Chile (indicadas con un asterisco y año en la Figura 2) a fin de mejorar la polinización del trébol rojo (Arretz & Macfarlane 1986) (Figura 2). Esta especie fue registrada en la naturaleza en Argentina por primera vez en 1993 en el Valle del Challhuaco, Parque Nacional Nahuel Huapi (Roig-Alsina & Aizen 1996).

A su vez, *Bombus terrestris* se introdujo comercialmente en Chile en 1997, principalmente para la polinización de tomate en invernadero, pero también con el objetivo de polinizar paltas y otros cultivos a campo. Con este fin, colmenas de esta especie fueron introducidas en varias localidades, de norte a sur: Arica, Copiapó, Ovalle, San Felipe, Quillota, Limache, Santiago, y Los Ángeles (Montalva et al. 2011); esta última localidad, junto al año de introducción, indicada con un asterisco en la Figura 2. Esta especie fue

registrada por primera vez en la naturaleza, en Argentina, en 2006 cerca de San Martín de Los Andes, en el Parque Nacional Lanín, próximo a la frontera con Chile (Torretta et al. 2006).

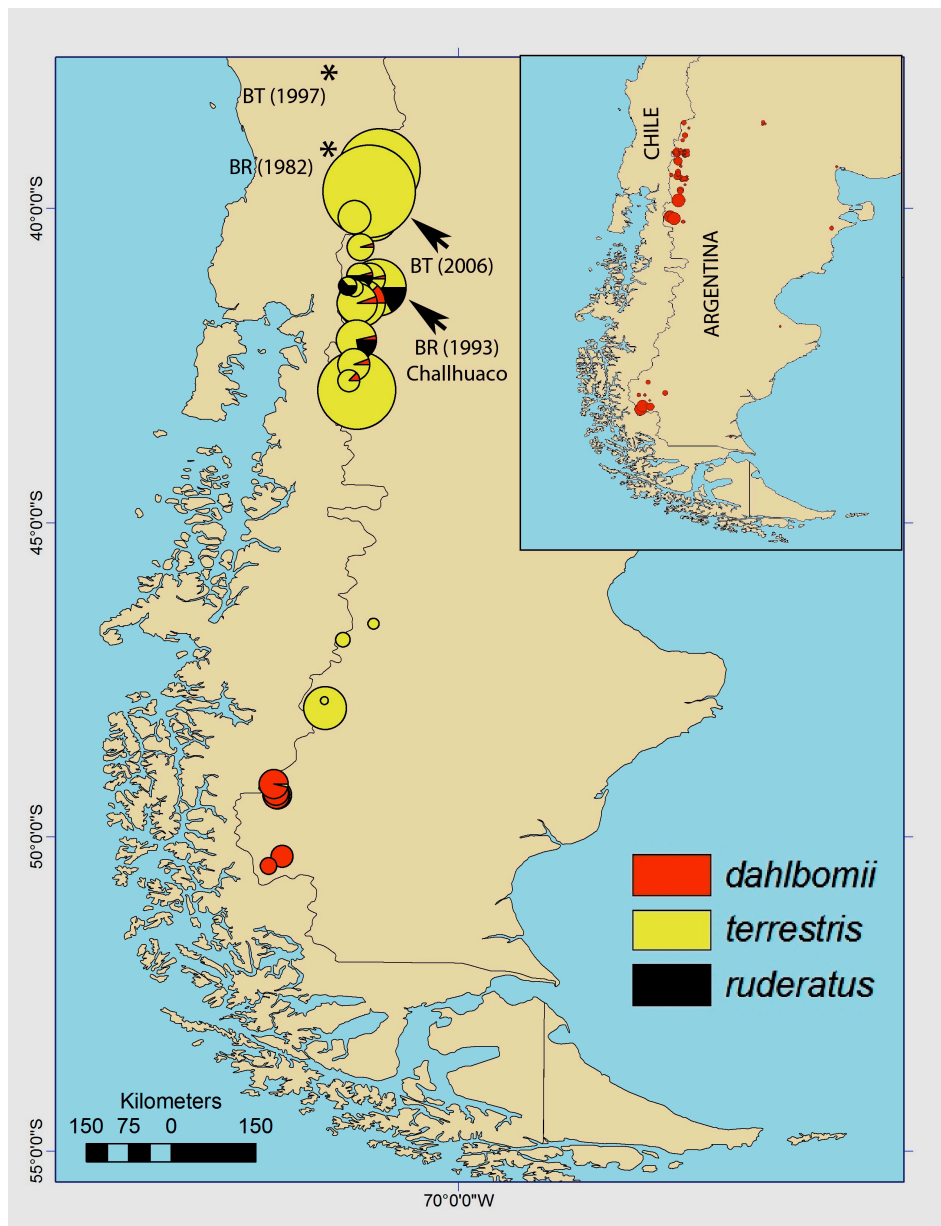


Figura 2: Mapa de la región estudiada. “BR (1982)” y “BT (1997)” indican los sitios y los años de la introducción inicial de *Bombus ruderatus* y *B. terrestris* respectivamente en Chile (Ruz 2002; Montalva y col. 2011); “BR (1993)” y “BT (2006)” indican los sitios y los años del primer reporte de *B. ruderatus* (Roig-Alsina y Aizen 1996) y *B. terrestris* (Torretta y col. 2006) en Argentina, respectivamente. El mapa pequeño insertado en el margen superior derecho, muestra la distribución y la abundancia aproximada de *B. dahlbomii* antes de la invasión de *B. ruderatus* y *B. terrestris*, en base a los datos de Abrahamovich y Díaz (2001). Los tamaños de las tortas, son proporcionales al número de individuos registrados en esa localidad en cada mapa, pero las abundancias entre los mapas no son comparables, debido a diferencias metodológicas.

La competencia entre especies nativas e introducidas puede ser un potencial mecanismo que determine la declinación de las nativas. Las interacciones de competencia por los recursos florales de especies de abejorros pueden estar influidas por el tamaño de las colonias, el tamaño del cuerpo, y la longitud de la lengua a través de diferentes demandas energéticas y el acceso a las flores de diferente profundidad (Heinrich 1976). Estudios previos indican que las obreras de *B. dahlbomii* son más grandes que las de *B. ruderatus*, pero el largo de la lengua de estas especies pertenecientes al grupo de los llamados “long tongued” o “long face” son similares (Madjidian et al. 2008). Por otra parte, las comparaciones llevadas a cabo en Europa muestran que *B. ruderatus* es más grande que *B. terrestris* (Hagen et al. 2011), y que *B. ruderatus* tiene una lengua más larga que *B. terrestris* (Goulson et al. 2005), con esta última especie perteneciente al grupo de los de lengua o cara corta (“short face” o “short tongue”) (Cameron et al. 2007). Sin embargo los rasgos corporales pueden, variar entre poblaciones/regiones, a lo largo de todo el ciclo de la colonia, y de acuerdo con la técnica de medición, por lo que es necesario obtener mediciones específicas para las tres especies en estudio y para esta región.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que los sistemas de la planta-polinizador son inherentemente dinámicos, son necesarios estudios de varios años para demostrar las tendencias reales de los cambios en la población de polinizadores en la naturaleza (Roubik 2001). Entonces, en ausencia de estudios a gran escala y largo plazo (Cameron et al. 2011), estimaciones robustas de los impactos de las invasiones, el alcance espacial, así como su impacto en diferentes componentes de la fauna nativa, son difíciles de obtener. Es por esto que, aunque algunos autores hayan notado una aparente disminución de *B. dahlbomii* (Ruz 2002; Montalva et al. 2011; Morales 2007), sus registros han sido acotados en el tiempo y/o espacio, por lo que se plantea la necesidad de ahondar en el patrón de declinación y sus causas si la hubiere, ya que la relación entre esta posible declinación y la invasión de abejorros permanece especulativa (Arbetman et al. 2013). En este capítulo presento los patrones a escala regional de distribución espacial y abundancia de abejorros en la Patagonia andina, basado en un muestreo a lo largo de ~ 1.270 kilómetros de norte-sur. Así mismo, muestro a

escala local, el patrón de reemplazo temporal de la especie nativa por las especies invasoras, en un bosque maduro del norte de la Patagonia, el Valle del Challhuaco (Figuras 1b). Esta serie temporal se basa en una compilación de datos propios tomados durante las temporadas 2011, y 2013, sumada a datos previos publicados (Aizen, 2001, Morales 2006, Morales 2007, Madjidian et al. 2008) así como inéditos (Morales, datos inéditos). Este escenario presenta una oportunidad única para explorar los efectos que genera la invasión de abejorros no nativos en una región con baja diversidad de abejorros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la época de muestreo

Diversos factores pueden influir en la observación y percepción de la abundancia de las especies en un momento y en un lugar determinado, por lo que es necesario conocer la dinámica del ciclo de vida de cada una de las especies. Por otro lado, y teniendo en cuenta que la descripción de las especies exóticas ha sido realizada en su mayoría en su hábitat nativo, es necesario determinar el correcto momento de muestreo, donde se encuentren todas las especies presentes. Las reinas de *B. terrestris* comienzan a forrajear desde finales del invierno a principios de la primavera (C. Morales, datos no publicados) seguido de *B. dahlbomii* a mediados de la primavera (octubre-noviembre; Aizen y col. 2002; C. Morales observación personal), mientras que las reinas de *B. ruderatus* empiezan a forrajear entre 4 a 6 semanas más tarde, a mediados-finales de la primavera (noviembre-diciembre; Aizen et al. 2002) (Figura 3). Por otro lado, los machos de *B. ruderatus* han sido registrados forrajando hasta finales de verano (mediados de marzo), mientras que *B. dahlbomii* ha sido registrado forrajando hasta mediados de otoño (mediados de abril), en el norte de la Patagonia (Abrahamovich et al. 2001) y *B. terrestris* hasta mediados de otoño (mayo) en una latitud similar en el sur de Chile (Ruz & Herrera 2001). Gracias a estos datos, se determinó la fecha de muestreo de enero a marzo, donde todas las especies se encuentran presentes.

Abundancia regional de abejorros

Durante el verano austral de 2011 (finales de enero a principios de marzo), se realizó el estudio de la abundancia de especies de abejorros en todo el rango conocido de *B. dahlbomii* en la Argentina, a lo largo de la vertiente oriental de los Andes (Figura 2). El área total de muestreo fue seleccionada de acuerdo con los mapas de distribución de *B. dahlbomii* en Argentina, utilizando el estudio más exhaustivo de distribución de la especie que se conoce (Abrahamovich & Díaz 2001), el cual se basa en una recopilación de registros de museos. El área de muestreo abarcó desde los 39.1513 °S hasta los 50.4635°S, incluyendo un amplio rango de altitudes, niveles de precipitación, y tipos de hábitat en los cuales se encontraba comúnmente *B. dahlbomii* en el pasado.

Se registraron los abejorros observados durante un período de 4 horas, caminando por senderos en 33 sitios de muestreo (Tabla S1). La ubicación específica de los sitios de muestreo se determinó de acuerdo a la disponibilidad de flores de abejorros, que incluye especies nativas (Por ejemplo, *Adesmia boronoides*, *Alstroemeria aurea*, *Colletia hystrix*, *Fuchsia magellanica*, *Luma apiculata*, *Myrceugenia exsucca*, y *Phacelia secunda*, entre otros) y las especies introducidas (por ejemplo, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, y *Carduus nutans*, entre otras). Debido a las limitaciones logísticas, cada sitio fue visitado una vez durante la temporada, entre el 28 de enero y el 7 de marzo.

En primer lugar, se evaluó si las especies observadas diferían en abundancia general. Dado que el desarrollo de las colonias difiere entre las especies (Figura 3), con *B. terrestris*, *B. dahlbomii*, y *B. ruderatus* emergiendo en este orden secuencial, se espera que la abundancia de abejorros de las diferentes especies varíe a lo largo de la temporada, lo cual podría introducir un sesgo.

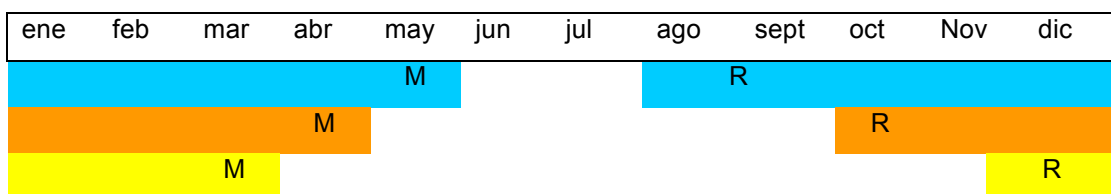


Figura 3: Duración (de mayor a menor) de las temporadas de cada especie de abejorro (celeste=*B. terrestris*; naranja=*B. dahlbomii* y amarillo=*B. ruderatus*). R= época donde emergen las reinas; M= época donde todavía se encuentran machos forrajeando.

Para controlar estos efectos fenológicos, se incorporó la fecha de muestreo (Tabla S1) como un término adicional en el modelo. Se modeló la abundancia de abejorros en función de las especies (factor categórico con tres niveles), la latitud y la fecha de muestreo (predictores continuos) usando modelos lineales generalizados (GLM) con la distribución de error binomial negativa (NBD) para tomar en cuenta la sobredispersión en los datos de conteo. Se eligió el mejor modelo comparando los valores de los Criterios de Información de Akaike (AIC) (Tabla S2).

También se exploró si hubo una tendencia latitudinal en la abundancia de especies para cada una por separado. Para ello, se modeló la abundancia de cada especie en función de la latitud y la fecha de muestreo utilizando GLM con NBD, y nuevamente se seleccionó el mejor modelo comparando los valores de AIC (Tabla S2). Por último, se testeó la correlación estadística entre la abundancia de *B. dahlbomii* con cada una de las especies exóticas por separado, mediante la prueba de correlación de Spearman. Se realizó la corrección de Bonferroni debido a la realización de múltiples tests.

Tendencias temporales en la composición y abundancia local de abejorros, en flores de amancay en el Valle del Challhuaco.

Se registró la abundancia e identidad de abejorros que visitan flores de amancay durante 17 temporadas de floración, que abarca un período de 20 años, de 1994 a 2013 (excluyendo 1999, 2000 y 2012) en el Valle del Challhuaco (Figura 1b). Para esta misma área *B. dahlbomii* había representado en 1994 y 1995 un ~ 94,5% y el 92% respectivamente, de las visitas a flores de Amancay (Aizen 2001); mientras que *B. ruderatus* representaba aproximadamente <1% de todas las visitas en los mismos años (Roig-Alsina & Aizen 1996; Aizen et al. 2002).

Los censos se llevaron a cabo entre mediados de enero y principios de marzo durante la floración del amancay, la cual está altamente sincronizada en la población en cada año (Aizen 2001). La mayoría de las especies entomófilas

de esta área florecen más temprano entre mediados de la primavera (*Ribes magellanicum*, *Berberis buxifolia*) y principios del verano (*Vicia nigricans*) (Morales & Aizen 2006). Así, la floración del amancay, especie herbácea dominante de esta comunidad vegetal relativamente pobre en especies, no se solapa con la floración de ninguna otra flor conspicua polinizada por insectos. En ese momento de la temporada, las obreras de las tres especies de abejorros se alimentan de forma activa en flores de amancay.

Se contaron el número de flores abiertas y se registraron la cantidad de abejorros que visitaron las flores en intervalos de 10 minutos en parcelas de 3 m × 3 m localizadas al azar en el sotobosque. Para cada especie, se calculó el número de abejorros por flor por hora, lo que permitió evaluar tendencias en la abundancia anual media de cada especie de abejorro a lo largo del tiempo, independientemente de la densidad de flores en la parcela.

La variación estocástica en la abundancia de abejorros sugiere que es necesario un mínimo de cuatro años para lograr capturar las tendencias temporales (Roubik 2001). Por lo tanto, el protocolo estandarizado de muestreo llevado adelante durante 17 estaciones de floración, junto con la relativa simplicidad (en términos de baja diversidad de especies) y la estabilidad (en términos de sincronía entre flores e interanual en la floración) de este sistema, permitió hacer un seguimiento fiable de los cambios en las tendencias temporales de la abundancia de abejorros.

Para poner a prueba la existencia de estas tendencias a lo largo del tiempo, en la abundancia de cada especie de abejorro que visitan las flores de amancay en el Valle del Challhuaco, se aplicaron modelos generalizados de mínimos cuadrados sin ninguna estructura de correlación o ponderación, que es equivalente a un modelo de regresión lineal ordinaria (Zuur et al. 2009).

Sin embargo, mediciones a lo largo del tiempo están fuertemente autocorrelacionadas, pudiendo violar el supuesto de independencia. Para detectar visualmente patrones de autocorrelación de los residuales, se graficó la función de autocorrelación (ACF) sobre distintas ventanas temporales (Figuras S1 a S4). El valor de la ACF para diferentes intervalos de tiempo indica si existe alguna autocorrelación en los datos (Zuur et al. 2009). Como enfoque alternativo para juzgar si existe autocorrelación, se ajustaron dos modelos adicionales diferentes que incluyen una estructura de

autocorrelación: (1) un modelo con la llamada estructura de simetría compuesta, lo que supone que cualquiera sea la distancia en el tiempo entre dos observaciones, su correlación residual es la misma, y (2) el modelo autorregresivo de orden 1 (AR-1), que modela residuales en el momento s como una función del residual del tiempo $s - 1$ junto con “el ruido” (en inglés noise sensu Zuur et al. 2009). Se compararon los tres modelos utilizando los criterios de información de Akaike (AIC) (Zuur et al. 2009).

Utilizando simulaciones, también se estimó la probabilidad de que el patrón de presencia-ausencia de *B. dahlbomii* encontrado a lo largo de 17 años, sea producto del azar. Para ello se estimó la probabilidad de no registrar ningún individuo de *B. dahlbomii* durante cinco muestreos consecutivos (temporadas), debido al azar, después de 12 temporadas consecutivas, en las que al menos un *B. dahlbomii* fue registrado visitando las flores Amancay, es decir pasar de 12 años de presencia a 5 años de ausencia en la serie temporal de 17 puntos de datos, como la proporción de 10.000 generaciones aleatorias de 17 celdas de una distribución binomial, donde cada elemento podría ser 0 o 1 con la misma probabilidad con, como mucho, un cambio (es decir, de 0 a 1, ó de 1 a 0) entre elementos consecutivos del set de datos. Todos los análisis se llevaron a cabo en el software libre R (Venables & Smith 2008), versión 2.12.0. Finalmente, cuando se indica, los valores finales de P reportados, se ajustaron con la corrección de Bonferroni, multiplicando el valor original para el número de comparaciones realizadas sobre el mismo set de datos.

Para tener en cuenta el ambiente, los efectos estacionales, los metodológicos y los específicos de la colonia, se compararon el ancho del tórax y la longitud de la lengua de obreras de las tres especies recolectadas en el mismo sitio (Valle del Challhuaco) durante el pico de floración del amancay (Madjidian et al. 2008). *Bombus ruderatus* y *B. dahlbomii* se recogieron en 2005, cuando todavía eran abundantes, mientras que *B. terrestris* se recolectó en 2011-2013.

RESULTADOS

Patrones regionales

El abejorro nativo *B. dahlbomii* se registró en 48% de los 33 sitios muestreados (Tabla S1), pero fue dominante (es decir, > 90% de todos los individuos observados) a nivel local en sólo el 18% de los sitios, los seis más australes de todo el área de estudio (Figura 2). *Bombus ruderatus* fue registrado en el 24% de los sitios incluidos en el muestreo pero no fue dominante en ninguno de ellos, mientras que *B. terrestris* fue la especie con mayor distribución en todo el rango de muestreo, registrado en el 88% de los sitios muestreados y localmente dominante en el 48% de ellos. En 29 años, *B. ruderatus* se dispersó aproximadamente unos 434 kilómetros más allá de los sitios en que fue liberado en el año 1982, mientras que *B. terrestris* se ha dispersado, unos ~ 1320 kilómetros hacia el sur del sitio más austral en que fue introducido en 1997 (Figura 2). En la mitad del tiempo (14 años) que *B. ruderatus*, *B. terrestris* mostró así, una tasa de invasión/dispersión seis veces mayor.

Bombus terrestris, que representó el 86% de todos los individuos registrados en todos los sitios, fue un orden de magnitud más abundante que *B. ruderatus* y que *B. dahlbomii* juntos (Figura 2; Tabla S1), y siendo significativamente más numeroso que *B. dahlbomii* ($Z = 4,42$; $P < 0,0001$); sin embargo la abundancia de *B. ruderatus* (que fue la especie menos numerosa), no fue significativamente diferente a la abundancia de *B. dahlbomii* ($Z = -1,603$; $P < 0,109$; Tabla 1).

El número de *B. dahlbomii* exhibió un aumento estacional y hacia el sur (fecha de muestreo = $0,099 \pm 0,036$, corregida por Bonferroni $P = 0,0015$; latitud = $0,511 \pm 0,104$, corregido por Bonferroni $P < 0,001$; Tabla 1) muy significativo. De manera similar a *B. dahlbomii*, la abundancia de *B. ruderatus* aumentó significativamente durante la temporada pero, a diferencia de la especie nativa, mostró una disminución hacia el sur (fecha de muestreo = $0,046 \pm 0,010$, corregido por Bonferroni $P < 0,0001$; latitud = $-0,602 \pm 0,156$, corregido por Bonferroni $P < 0,001$). No se encontraron efectos estacionales en la abundancia de *B. terrestris* (fecha de muestreo = $0,022 \pm 0,018$, corregido por Bonferroni $P = 0,642$). De manera similar a *B. ruderatus*, el

número de *B. terrestris* disminuyó significativamente hacia el sur (latitud = $-0,305 \pm 0,066$, corregido por Bonferroni $P < 0,001$).

La abundancia de *B. dahlbomii* estuvo correlacionada de forma negativa y significativa con la abundancia de *B. terrestris* ($r = -0.42$, $P = 0,030$, corregido por Bonferroni), pero no estuvo correlacionada de forma significativa con la abundancia de *B. ruderatus* ($r = -0.29$, $P = 0,197$, corregido por Bonferroni) en la escala geográfica. Sin embargo, los únicos sitios en todo el rango latitudinal del área de estudio en el que las poblaciones de *B. dahlbomii* fueron abundantes, son aquellos en las que ambas especies invasoras estaban ausentes o eran muy escasas (Figura 2; Tabla S1). Por lo tanto, el muestreo espacial proporciona evidencias de una declinación a escala regional de *Bombus dahlbomii* y su relación con la presencia de abejorros invasores, especialmente *B. terrestris*.

Patrones a largo plazo a escala local

La asociación negativa entre las tendencias geográficas de abundancia de la especie nativa y las invasoras, tiene su paralelo en gran medida en los resultados del muestreo local a largo plazo de los visitantes a flores de amancay en el Valle del Challhuaco. En total, se acumularon 1219 períodos de observación (de 10 minutos de duración) en 208 días de muestreo a lo largo de 17 años. La Figura 4, muestra la variación anual en el número promedio de abejorros de cada especie, que visitan las flores Amancay por hora, desde el año 1994 al 2013. La incorporación de autocorrelación no mejoró el modelo de regresión lineal inicial (Tabla 1; Figuras Suplementarias 1-4); Por lo tanto, se presentan sólo los resultados del modelo de regresión lineal.

Entre 1994 y 2013, la abundancia *B. dahlbomii* disminuyó significativamente (año = $-0,004 \pm 0,001$, $P < 0,001$, $n = 17$; Figura 4). Por otra parte, desde el año 2008 no se registraron individuos de *B. dahlbomii* en el área en ninguno de los cinco años de muestreos consecutivos posteriores. La probabilidad de que esto sea el resultado de la variación estocástica interanual, es equivalente a 0,017, lo que sugiere que la población local ya no está presente en el lugar. Por el contrario, de 1994 a 2005, *B. ruderatus* mostró un aumento

en la abundancia con tendencia positiva y significativa (Año = $0,013 \pm 0,004$, $P = 0,014$, $n = 10$; Figura 4). Sin embargo, desde 2006, cuando *B. terrestris* se detectó por primera vez en la región a 2013, la abundancia de *B. ruderatus* parece declinar, pero esta tendencia negativa no fue significativa (año = $-0,017 \pm 0,010$, $n = 7$, $P = 0,324$, corregida por Bonferroni). En el mismo período, la abundancia de *B. terrestris* exhibió una aumento, aunque con tendencia no significativa, (año = $0,019 \pm 0,009$, $n = 7$, $P = 0,159$, corregida por Bonferroni). Esta falta de significancia es probablemente debido a la alta fluctuación interanual en la abundancia y a la menor longitud de la serie de datos post-invasión en comparación con la serie temporal anterior a la invasión y la concomitante menor potencia estadística de la prueba (Figura 4).

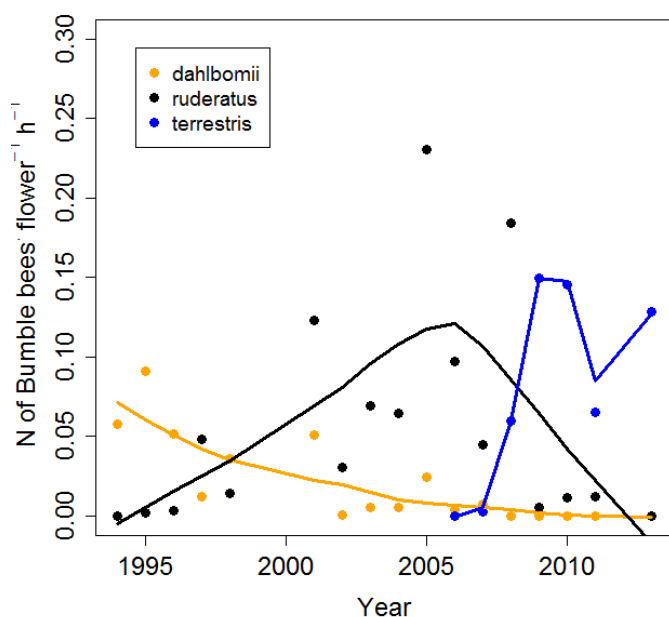


Figura 4: Cambios en las abundancias de las tres especies de abejorros que visitan las flores de Amancay en el Valle del Challhuaco. Cada punto representa el promedio anual. Las líneas de ajuste fueron obtenidas por regresiones locales no paramétricas (del inglés "locally weighted scatter plot *smooth*", LOESS) sobre los datos observados.

La abundancia de *B. dahlbomii* durante las dos décadas estuvo fuertemente correlacionada de forma negativa con las abundancias de las dos especies invasoras agrupadas (r de Spearman = $-0,68$, $P = 0,002$, $n = 17$) y estuvo correlacionada de forma negativa, aunque no significativa, con la abundancia

B. ruderatus antes de que *B. terrestris* hubiera llegado ($r = -0,56$, $P = 0,096$, $n = 10$), pero no después de su llegada ($r = 0,44$, $P = 0,633$, corregida por Bonferroni, $n = 7$). Sin embargo, la abundancia *B. dahlbomii* se correlacionó de forma negativa con la abundancia de *B. terrestris*, aunque esta correlación fue marginalmente significativa cuando se consideran sólo los años posteriores a la invasión ($r = -0,76$, $P = 0,097$, corregida por Bonferroni, $n = 7$).

a) <i>Bombus dahlbomii</i>			
Modelo	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados
Estructura de Correlación	Cuadrados Mínimos Ordinarios	Simetría Compuesta	ARMA (1,0)
AIC	-63,5	-61,5	-61,9
BIC	-61,4	-58,7	-59,0
Grados de libertad (total, residuales)	(17, 15)	(17, 15)	(17, 15)
Coefficiente para el año y significancia asociada	$-0,0036 \pm ,0007$ $P = 0,0002$	$-0,0036 \pm 0,0007$ $P = 0,0002$	$-0,00356 \pm 0,0008$ $P = 0,0008$
Parámetro	Ninguno	$Rho = 2,8 \times 10^{-7}$	$Phi = 0,176$
Residual SE	0,017	0,017	0,018
b) <i>Bombus ruderatus</i> antes de la invasión de <i>Bombus terrestris</i>			
Modelo	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados
Estructura de Correlación	Cuadrados Mínimos Ordinarios	Simetría Compuesta	ARMA (1,0)
AIC	-11,558	-9,558	-9,585
BIC	-11,3201	-9,241	-9,267
Grados de libertad (total, residuales)	(10,8)	(10,8)	(10,8)
Coefficiente para el año y significancia asociada	$0,0133 \pm 0,004$ $P = 0,0145$	$0,0133 \pm 0,004$ $P = 0,0145$	$0,0129 \pm 0,0038$ $P = 0,0098$
Parámetro	Ninguno	$Rho = 1,25E-17$	$Phi = -0,1276$
Residual SE	0,051	0,051	0,050
c) <i>Bombus ruderatus</i> luego de la invasión de <i>Bombus terrestris</i>			

Modelo	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados
Estructura de Correlación	Cuadrados Mínimos Ordinarios	Simetría Compuesta	ARMA (1,0)
AIC	-2,45	-0,4558	-0,924
BIC	-3,628	-2,018	-2,4859
Grados de libertad (total, residuales)	(7,5)	(7,5)	(7,5)
Coefficiente para el año y significancia asociada	-0,01665±0,0101 P = 0,162	-0,01665±0,0101 P = 0,162	-0,0177±0,0086 P = 0,094
Parámetro	None	Rho = 9,837E-07	Phi= 0,3
Residual SE	0,0599	0,0599	
d) <i>Bombus terrestris</i>			
Modelo	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados	Cuadrados Mínimos Generalizados
Estructura de Correlación	Cuadrados Mínimos Ordinarios	Simetría Compuesta	ARMA (1,0)
AIC	-4,2847	-2,2847	-3,5732
BIC	-5,456	-3,8469	-5,1354
Grados de libertad (total, residuales)	(7,5)	(7,5)	(7,5)
Coefficiente para el año y significancia asociada	0,0186 ± 0,0084 P = 0,0797	0,0186 ± 0,0084 P = 0,0797	0,0178 ± 0,2304 P = 0,0132
Parámetro	None	Rho = 2,287E-17	Phi= 0,645
Residual SE	0,0499	0,0499	0,06678

Tabla 1: Resumen de los modelos testados para las tendencias temporales de la abundancia de abejorros en el Valle del Challhuaco. AIC= Criterio de información de Akaike; BIC= Criterio de información Bayesiana; SE= error estándar; ARMA= promedio auto-regresivo.

Las obreras de las tres especies de abejorros mostraron ser significativamente diferentes en el ancho de tórax ($R^2 = 0,34$; análisis de varianza [ANOVA] $F_{(2, 125)} = 33,84$; $P < 0,0001$) y la longitud de la lengua ($R^2 = 0,61$; ANOVA $F_{(2, 125)} = 98,73$; $P < 0,001$). *Bombus dahlbomii* tuvo un tórax significativamente más ancho (media ± desviación estándar [DE]: $5,88 \pm 0,39$

mm) que cualquiera de las especies invasoras (ambas pruebas “honestas” de Tukey con diferencias significativas [HSD] $P < 0,001$); el tórax de *B. terrestris* fue significativamente más ancho que el de *B. ruderatus* ($5,50 \pm 0,50$ mm y $5,04 \pm 0,44$ mm, respectivamente, HSD de Tukey $P < 0,001$). Sin embargo, la longitud de la lengua no difirió significativamente entre *B. dahlbomii* y *B. ruderatus* (media \pm DE: $11,54 \pm 1,82$ mm y $11,86 \pm 1,56$ mm, respectivamente, Tukey HSD $P = 0,61$), aunque ambas especies tuvieron lenguas significativamente más largas que *B. terrestris* ($7,95 \pm 1,09$ mm, tanto HSD de Tukey $P < 0,001$) (Figura 5).

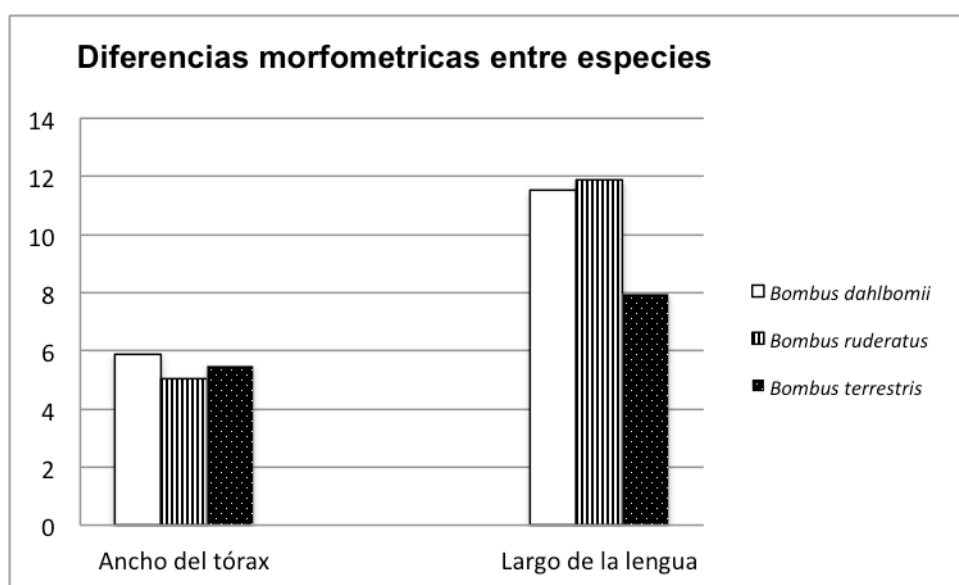


Figura 5: Datos morfométricos para las tres especies de abejorros presentes en Patagonia. Ancho del tórax y largo de lengua en mm.

CONCLUSIONES

Este estudio documenta la extensión y la velocidad de invasión de dos especies de abejorros introducidos en el sur Argentina, y muestra que el invasor más reciente en llegar a la región de la Patagonia, *B. terrestris*, se ha convertido rápidamente en la especie más abundante, reemplazando parcialmente no sólo a la especie nativa *B. dahlbomii* sino también al primer abejorro invasor en arribar, *B. ruderatus*. La extensión geográfica del reemplazo (ya sea total o parcial) de *B. dahlbomii* por abejorros invasores en gran parte de su área de distribución es muy llamativa (Figura 2); este

proceso se inició, al menos en el Valle del Challhuaco, con la introducción de *B. ruderatus* y fue reforzada más tarde por la llegada de *B. terrestris*. Dos años después de la detección de *B. terrestris* en el norte de Patagonia (2006), *B. dahlbomii* desapareció por completo del Valle del Challhuaco (Figura 4).

El estudio regional documenta el avance de unos 120 km hacia el sur del frente de invasión de *B. ruderatus* y unos 650 km para *B. terrestris*, más allá de las distribuciones más recientes reportadas (Montalva et al. 2011); y revela que, en Argentina, la velocidad y el grado de propagación de *B. terrestris* es mayor que el de *B. ruderatus*. Este patrón es similar al que se encuentra en Nueva Zelanda, donde ambas especies fueron introducidas en el siglo XIX (Macfarlane & Gurr 1995), y donde *B. terrestris* se encuentra más ampliamente distribuido que *B. ruderatus* (Goulson & Hanley 2004). El mayor tamaño de las colonias, la mayor duración de su ciclo anual y el uso más generalista de recursos florales (Montalva et al. 2011; Morales et al. 2016) por el abejorro de lengua corta, *B. terrestris* podrían haber contribuido en parte a su mayor éxito.

El colapso dramático de las poblaciones de *B. dahlbomii* durante las últimas dos décadas en el norte de la Patagonia coincide temporal y espacialmente con la propagación de los dos especies de abejorros invasores. De hecho, la comparación de la distribución histórica (Abrahamovich & Díaz 2001) con la resultante de los muestreos realizados en 2011 (mapa del recuadro vs. mapa central de la Figura 2) en conjunto con otros estudios, tanto contemporáneos realizados a escala regional en Argentina y Chile (Schmid-Hempel et al. 2014), como previos realizados en el NO de la Patagonia Argentina (Aizen 2001; Morales & Aizen 2002; Vázquez & Simberloff 2003), revelan que en el inicio de este milenio, *B. dahlbomii* era común en las regiones donde está hoy ausente, incluyendo aquellas áreas donde *B. ruderatus* y *B. terrestris* se registraron por primera vez (Figura 2, Tabla S1). Estos resultados, si bien de naturaleza correlativa, sugieren una fuerte retracción de la distribución histórica de *B. dahlbomii* asociada a la invasión de abejorros introducidos. La declinación de los polinizadores en general, y de los abejorros nativos en particular, es una tendencia mundial; junto con las especies invasoras, otros factores relacionados y concurrentes, tales como los cambios en el uso de la

tierra y la fragmentación del hábitat, los agroquímicos, el cambio climático, y los patógenos han recibido considerable atención como posibles factores causales de estas declinaciones (Williams & Osborne 2009; Potts et al. 2010; Cameron et al. 2011).

Este estudio se llevó a cabo principalmente en parques nacionales y áreas relativamente vírgenes que carecen de agricultura intensiva o grandes asentamientos urbanos. De este modo, los pesticidas, la contaminación ambiental y la fragmentación hábitat no parecen ser las causas probables en este caso. Además, dado que los abejorros invasores en esta región pueden beneficiarse de la perturbación del hábitat (Morales & Aizen 2002; Aizen & Feinsinger 2003), se espera que si dichas perturbaciones jugaran un papel en la disminución *B. dahlbomii*, esto sea mediado por el aumento de la abundancia de abejorros invasores.

Alternativamente, las migraciones hacia los polos por parte de las especies adaptadas al frío, como los abejorros, y en particular *B. dahlbomii*, son esperables en un escenario de calentamiento global. En este caso, la retracción de *B. dahlbomii* hacia el sur y la casi extirpación de las poblaciones de la parte norte de su distribución (Figura 2), son consistentes con las predicciones de cambio climático. Sin embargo, el colapso extremadamente rápido aquí informado sugiere que el cambio climático es una explicación poco probable (al menos como único factor) para provocar la declinación del abejorro nativo *B. dahlbomii*. El estudio de los factores climáticos y su impacto sobre la distribución de esta especie contribuiría a desentrañar los mecanismos involucrados en su colapso.

Si bien estudiar los mecanismos subyacentes que vinculan la disminución de *B. dahlbomii* con la expansión de abejorros invasores, excede el alcance de este capítulo, una comparación de patrones espacio-temporales sugiere que la importancia de las diferentes especies invasoras y mecanismos asociados podrían variar en diferentes escalas espaciales. A escala regional la Figura 2 sugiere que la propagación de *B. ruderatus* ha sido relativamente limitada a la porción norte de la distribución de *B. dahlbomii*, mientras que *B. terrestris* la ha invadido casi en su totalidad. Por lo tanto, en las zonas donde *B. ruderatus* no ha invadido, la desaparición de *B. dahlbomii* parece estar directamente relacionado con *B. terrestris*. Como esta especie es muy invasora y ha

alcanzado abundancias locales extremadamente altas (Figura 2), tiene colonias más grandes, se caracteriza por tener un ciclo más largo de sus colonias que las de *B. dahlbomii*, y parece ser una especie generalista (Montalva et al. 2011; Morales et al. 2016), la competencia por los recursos no puede ser descartada.

A escala local, *B. ruderatus* parece haber desencadenado la declinación de la población de *B. dahlbomii*, la cual parece haber sido acentuada después de la invasión *B. terrestris*. El extraordinario éxito de *B. ruderatus* en el Valle del Challhuaco (Figura 4), en comparación con otras regiones puede explicarse por el hecho de que el recurso floral dominante es una especie de corola larga (Figura 1b), de fácil acceso y manipulación a las lenguas inusualmente largas de *B. ruderatus*. Una comparación de la eficiencia de forrajeo *B. dahlbomii* entre y *B. ruderatus* antes de la llegada de *B. terrestris*, sin embargo, rechaza competencia por los recursos con *B. ruderatus*, como una explicación de la inicial disminución *B. dahlbomii* (Aizen et al. 2011).

La evidencia circunstancial y en particular la velocidad del reemplazo, indican que la hipótesis de transmisión de patógenos posiblemente introducidos junto con los abejorros no nativos debe ser evaluada, hipótesis que dio lugar al estudio desarrollado en los Capítulos 2 y 4 de esta tesis.

Desde una perspectiva más amplia, estos resultados ponen de manifiesto los riesgos asociados a la introducción de especies de *Bombus* no nativas en todo el mundo. Aquí se muestra cómo la disminución de los polinizadores nativos puede ocurrir a un ritmo inesperadamente rápido, lo cual complica o inhibe la potencial restauración de sus poblaciones.

REFERENCIAS

- Abrahamovich, A.H. & Díaz, N.B., 2001. Distribución geográfica de las especies del género *Bombus* Latreille (Hymenoptera, Apidae) en Argentina. *Rev. Bras. Entomol*, 45, pp.23–36.
- Abrahamovich, A.H., Tellería, M.C. & Díaz, N.B., 2001. *Bombus* species and their associated flora in Argentina. *Bee World*, 82(2), pp.76–87.
- Aizen, M.A., 2001. Flower sex ratio, pollinator abundance, and the seasonal pollination dynamics of a protandrous plant. *Ecology*, 82(1), pp.127–144.
- Aizen, M.A., Vázquez, D.P. & Smith-Ramírez, C., 2002. Historia natural y conservación de los mutualismos planta-animal del bosque templado de Sudamérica austral. *Revista chilena de historia natural*, 75, pp.79–97.
- Aizen, M.A. & Feinsinger, P., 2003. Bees not to be? Responses of insect pollinator faunas and flower pollination to habitat fragmentation. In G. A. Bradshaw & P. A. Marquet, eds. *How Landscapes change*. Springer, pp. 111–129.
- Aizen, M.A., Lozada, M. & Morales, C.L., 2011. Comparative nectar-foraging behaviors and efficiencies of an alien and a native bumble bee. *Biological Invasions*, 13(12), p.2901–2909.
- Arbetman, M.P. et al., 2013. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biological Invasions*, 15(3), pp.489–494.
- Arretz, P. V & Macfarlane, R.P., 1986. The introduction of *Bombus ruderatus* to Chile for red clover pollination. *Bee World*, 67, pp.15–22.
- Cameron, S.A. et al., 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp1-6
- Cameron, S.A., Hines, H.M. & Williams, P.H., 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(1), pp.161–188.
- Goulson, D. & Hanley, M.E., 2004. Distribution and forage use of exotic bumblebees in South Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*, 28(2), pp.225–232.

- Goulson, D. et al., 2005. Causes of rarity in bumblebees. *Biological Conservation*, 122(1), pp.1–8.
- Hagen, M., Wikelski, M. & Kissling, W.D., 2011. Space use of bumblebees (*Bombus* spp.) revealed by radio-tracking. *PloS one*, 6(5), p.e19997.
- Ings, T.C., Schikora, J. & Chittka, L., 2005. Bumblebees, humble pollinators or assiduous invaders? A population comparison of foraging performance in *Bombus terrestris*. *Oecologia*, 144(3), pp.508–516.
- Macfarlane, R.P. & Gurr, L., 1995. Distribution of bumble bees in New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 18.
- Madjidian, J.A.J.A., Morales, C.L. & Smith, H.G., 2008. Displacement of a native by an alien bumblebee: Lower pollinator efficiency overcome by overwhelmingly higher visitation frequency. *Oecologia*, 156(4), pp.835–845.
- Montalva, J. et al., 2011. Geographic distribution and associated flora of native and introduced bumble bees (*Bombus* spp.) in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 50(1), pp.11–21.
- Morales, C.L. & Aizen, M.A., 2002. Does invasion of exotic plants promote invasion of exotic flower visitors? A case study from the temperate forests of the southern Andes. *Biological Invasions*, 4(1–2), pp.87–100.
- Morales, C.L. & Aizen, M.A., 2006. Invasive mutualisms and the structure of plant–pollinator interactions in the temperate forests of north west Patagonia, Argentina. *Journal of Ecology*, 94(1), pp.171–180.
- Morales, C.L., 2007. Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecología Austral*, 17, pp.51–65.
- Morales, C.L. et al., 2016. Floral traits selected by european bumblebees (*Bombus*) in southern lands: a comparison among species and regions. In Conference: VIII Southern Connections Congress, At Punta Arenas, Chile.
- Potts, S.G. et al., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), pp.345–353.
- Ramos-Jiliberto, R. et al., 2009. A network analysis of plant-pollinator interactions in temperate rain forests of Chiloé Island, Chile. *Oecologia*, 160(4), pp.697–706.

- Roig-Alsina, A. & Aizen, M.A., 1996. *Bombus ruderatus* Fabricius, un nuevo *Bombus* para la Argentina (Hymenoptera: Apidea). *Physis*, 5, p.49–50.
- Roubik, D.W., 2001. Ups and downs in pollinator populations: When is there a decline? *Conservation Ecology*, 5(1), p.2.
- Ruz, L., 2002. Bee Pollinators Introduced to Chile: a Review. In K. P. & I. F. VL, ed. *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. Brasilia: Ministry of Environment / Brasília, pp. 155–167.
- Ruz, L. & Herrera, R., 2001. Preliminary observations on foraging activities of *Bombus dahlbomii* and *Bombus terrestris* (Hym: Apidae) on native and non native vegetation in Chile. *Acta Horticola*, 561, pp.165–169.
- Schmid-Hempel, P. & Schmid-Hempel, R., 1993. Transmission of a pathogen in *Bombus terrestris*, with a note on division of labour in social insects. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 33(5), pp.319–327.
- Schmid-Hempel, R. et al., 2014. The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. *The Journal of animal ecology*, 83(4), pp.823–837.
- Torretta, J.P., Medan, D. & Abrahamovich, A.H., 2006. First record of the invasive bumblebee *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) in Argentina. *Transactions of the American Entomological Society*, 132(3/4), pp.285–289.
- Vázquez, D.P. & Simberloff, D., 2004. Indirect effects of an introduced ungulate on pollination and plant reproduction. *Ecological Monographs*, 74(2), pp.281–308.
- Velthuis, H. & van Doorn, A., 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4), pp.421–451.
- Venables, W.N. & Smith, D.M., 2008. The R Development Core Team.
- Williams, P.H. et al., 2008. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39(1), pp.46–74.
- Williams, P.H. & Osborne, J.L., 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40(3), pp.367–387.
- Zuur, A.F. et al., 2009. Zero-Truncated and Zero-Inflated Models for Count Data. In *Mixed effect models and extensions in ecology in R*. pp. 261–293.

MATERIAL SUPLEMENTARIO:

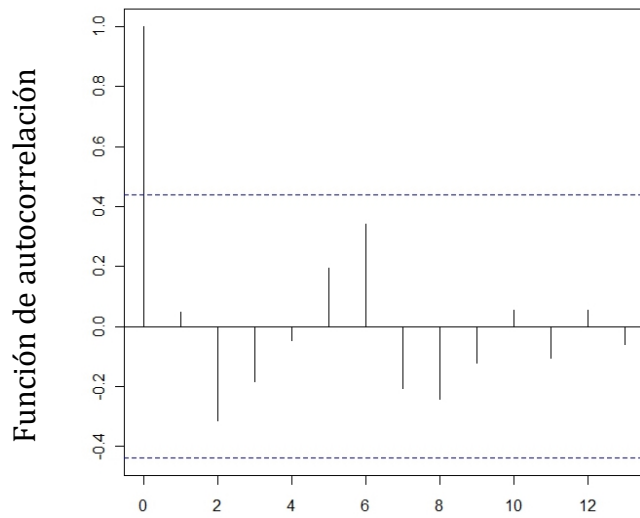


Figura S1: Gráfico de autocorrelación de residuos del modelo de mínimos cuadrados para individuos de *B. dahlbomii* por flor de amancay/hora, en función del año. Los valores absolutos de la función de autocorrelación que resultaron mayores que los límites marcados con líneas punteadas, indican autocorrelación significativa.

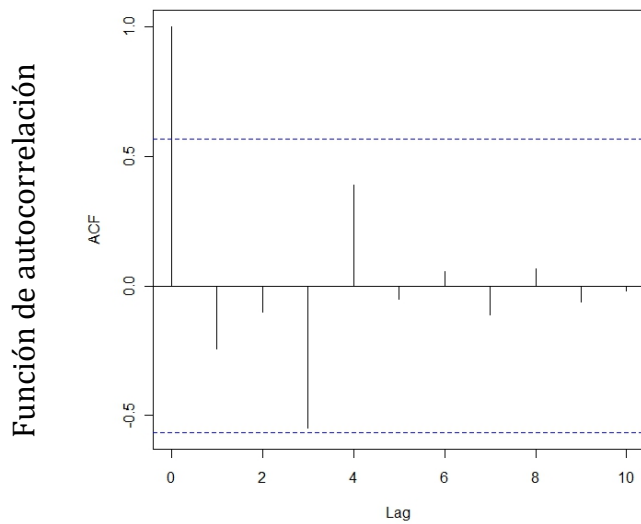


Figura S2: Gráfico de autocorrelación de residuos del modelo de mínimos cuadrados para individuos de *B. ruderatus*, pre invasión de *B. terrestris* por flor de amancay/hora, en función del año. Los valores absolutos de la función de autocorrelación que resultaron mayores que los límites marcados con líneas punteadas, indican autocorrelación significativa.

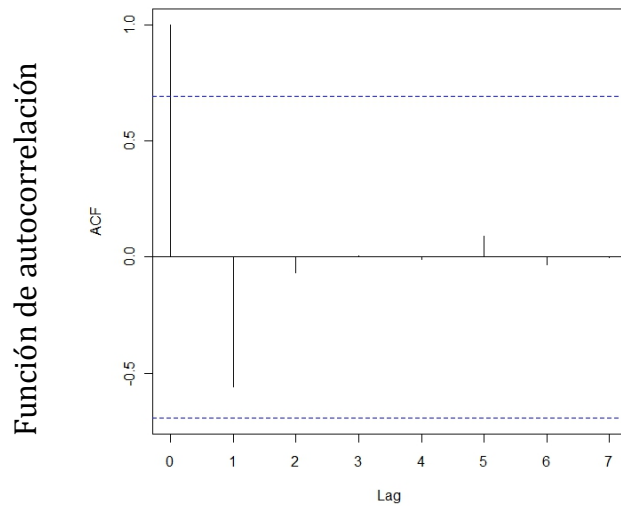


Figura S3: Gráfico de autocorrelación de residuales del modelo de mínimos cuadrados para individuos de *B. ruderatus*, post invasión de *B. terrestris* por flor de amancay/hora, en función del año. Los valores absolutos de la función de autocorrelación que resultaron mayores que los límites marcados con líneas punteadas, indican autocorrelación significativa.

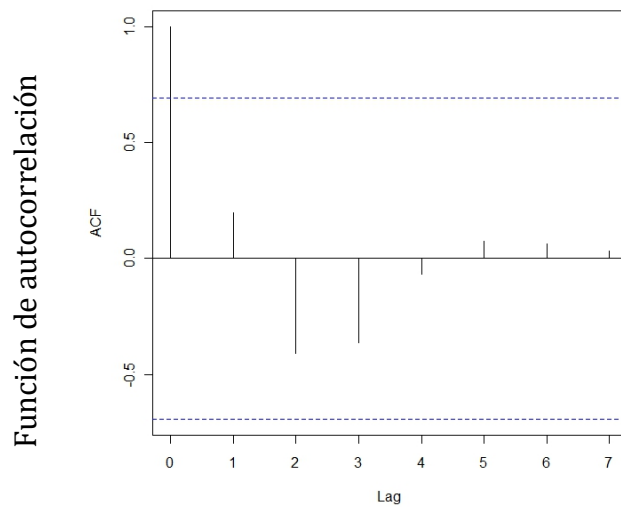


Figura S4: Gráfico de autocorrelación de residuales del modelo de mínimos cuadrados para individuos de *B. terrestris* por flor de amancay/hora, en función del año. Los valores absolutos de la función de autocorrelación que resultaron mayores que los límites marcados con líneas punteadas, indican autocorrelación significativa.

Tablas Suplementarias

Localidad	Fecha	<i>B. dahlbomii</i>	<i>B. ruderatus</i>	<i>B. terrestris</i>	Longitud (O) (grados decimales)	Latitud (S) (grados decimales)
Ñorquinco	28/01/11	0	6	21	71.2565°	39.1513°
Quillen	28/01/11	0	0	225	71.2580°	39.3884°
Huechulafquen	29/01/11	0	0	285	71.4199°	39.7304°
Lacar ⁽¹⁾	30/01/11	0	8	68	71.3367°	40.1381°
Chachin	30/01/11	0	0	36	71.6535°	40.1420°
Camino a Lacar	30/01/11	0	0	3	71.5017°	40.1514°
Traful	31/01/11	1	0	23	71.5563°	40.6151°
Llao-Llao	03/03/11	0	2	6	71.5468°	41.0508°
Bahía Lopez	01/03/11	1	11	10	71.5687°	41.0749°
Brazo Tristeza	06/03/11	1	0	31	71.4055°	41.1173°
Pampa linda	04/03/11	0	7	4	71.7630°	41.2340°
Challhuaco ⁽²⁾	24/02/11	0	18	90	71.2813°	41.2595°
Los Cesares	04/03/11	0	0	10	71.6555°	41.2671°
Mascardi	04/03/11	2	0	17	71.5793°	41.3357°
Seccional Steffen	06/03/11	10	0	66	71.5428°	41.5056°
Fondo L. Steffen	05/03/11	3	0	51	71.6085°	41.5114°
Lago Puelo	07/03/11	2	12	40	71.6207°	42.0973°
Pasar. Arrayanes	19/02/11	2	0	32	71.6656°	42.4876°
Lago Verde	19/02/11	2	0	2	71.7293°	42.7186°
Río Arrayanes	18/02/11	2	0	14	71.7433°	42.7409°
L. Futalaufquen	18/02/11	0	0	5	71.5959°	42.8765°
Villa Futalaufquen	18/02/11	0	2	201	71.6165°	42.8945°
Esquel	18/02/11	0	0	7	71.3092°	42.9086°
Camino Antiguos	04/02/11	0	0	4	71.3504°	46.6105°
Monte Zeballos	05/02/11	0	0	7	71.8397°	46.8624°
Penín. Belgrano	08/02/11	0	0	2	72.1343°	47.8339°
Lago Burmeister	07/02/11	0	0	61	72.1197°	47.9518°
Camin. L. Desierto	12/02/11	27	0	1	72.9432°	49.1624°
Chorrillo	24/02/11	21	0	0	72.9038°	49.2993°

Chalten	09/02/11	26	0	1	72.8854°	49.3305°
Picada Torre	11/02/11	24	0	0	72.9004°	49.3343°
Punta Bandera	14/02/11	16	0	0	72.8048°	50.3121°
Glaciar P. Moreno	15/02/11	9	0	0	73.0238°	50.4635°
Total		149	66	1323		
Promedio más desvío por sitio		5 ±8	2 ±4	40 ±68		

Tabla Suplementaria 1: Número de individuos de cada especie muestreada por sitio durante el verano de 2011

Variable respuesta	Predictor	AIC
Abundancia total de especies	Especie	543,7
	especie + latitud	545,7
	especie + fecha de muestreo	545,7
	especie + latitud + fecha de muestreo	547,7
abundancia de <i>B. dahlbomii</i>	Latitud	134,87
	latitud + fecha de muestreo	128,38
abundancia de <i>B. ruderatus</i>	Latitud	206,85
	latitud + fecha de muestreo	185,9
abundancia de <i>B. terrestris</i>	Latitud	284,99
	latitud + fecha de muestreo	285,64
Nota: los valores de AIC en negrita, indican el mejor ajuste (el modelo más parsimonioso).		

Tabla Suplementaria 2: Resumen de los valores AIC (Criterio de información de Akaike) para los modelos de regresión binomial del total de abundancia de abejorros y la abundancia de cada especie por separado, de acuerdo al muestreo regional.



CAPÍTULO 4

LA INTRODUCCIÓN DE PARÁSITOS PATÓGENOS COMO POTENCIAL CAUSA DE LA DECLINACIÓN DE *BOMBUS DAHLBOMII*



RESUMEN

El comercio mundial de abejorros (*Bombus* spp.) puede contribuir a propagar enfermedades, las cuales han sido citadas como una potencial causa de declinación en este género. Se sabe que las poblaciones de *Bombus terrestris*, uno de los abejorros introducidos que invadieron el NO de la Patagonia de Argentina en 2006, se encuentran infectadas con *Apicystis bombi*, un protozoo altamente patogénico. Me pregunté si este parásito pudo haberse transmitido de *B. terrestris*, hacia las otras dos especies de abejorros que se encontraban presentes en la región: la especie europea introducida *Bombus ruderatus* y el abejorro nativo *Bombus dahlbomii*. Para ello analicé muestras de abejorros en búsqueda de *A. bombi* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en especímenes recolectados antes y después de la invasión de *B. terrestris* y en muestras de este último. Las muestras que generaron bandas compatibles con *A. bombi* (i.e. muestras positivas), fueron nuevamente procesadas por medio de una PCR para amplificar las regiones hipervariables que comprenden los ITS (espaciadores internos de transcripción) de la subunidad pequeña del ribosoma, y así conocer su variabilidad genética.

Previo a la invasión de *B. terrestris*, no encontré bandas compatibles con *A. bombi* en muestras de ninguna de las dos especies presentes, pero sí en las tres especies de abejorros recolectadas posteriormente a la llegada de *B. terrestris*, incluida ésta última. La identidad del parásito fue establecida mediante la secuenciación de una porción del ADN que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma (18S). Tanto las secuencias de los parásitos encontrados en las tres especies de abejorros de Patagonia, como la identificada en otros abejorros de Europa fueron 100% idénticos, confirmando que la especie era *A. bombi*. El análisis de redes de haplotipos muestra una única población de parásitos sin estructuración geográfica. Estos resultados, sugieren que la Patagonia habría estado libre de *A. bombi* hasta que este parásito se introdujo conjuntamente con *B. terrestris*, contagiando *in situ* a las dos especies de abejorros que habitaban previamente la región, resultado que se apoya también en la baja variabilidad genética y sin estructuración del parásito. En este trabajo se reportan por primera vez a nivel mundial dos

nuevos hospedadores de *A. bombi*: *B. ruderatus* y *B. dahlbomii*. Todos estos resultados proporcionan evidencias circunstanciales de una potencial relación entre el colapso poblacional y la retracción geográfica de *B. dahlbomii*, con la invasión de *B. terrestris* y la co- introducción de este nuevo parásito patógeno.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas emergentes son cada vez más reconocidas como una de las posibles causas de la declinación de abejorros (Goulson et al. 2008b; Williams & Osborne 2009; Meeus et al. 2011). Debido a que la cría masiva y el comercio internacional de *Bombus terrestris* para la polinización de cultivos se ha convertido en una gran industria (Velthuis & van Doorn 2006), la propagación de patógenos hacia sus congéneres nativos (Colla et al. 2006) puede convertirse en una amenaza para la fauna de abejorros en todos los continentes (Goka et al. 2001). Los abejorros criados en factorías y a gran escala, a menudo tienen altos niveles de patógenos (Meeus et al. 2011), que pueden ser transmitidos a sus congéneres nativos si estos escapan de los invernaderos en donde son generalmente utilizados (Colla et al. 2006). A pesar de dificultades para demostrar dicho fenómeno (Meeus et al. 2011), los indicios más fuertes para apoyar la hipótesis del contagio, surgen de la combinación de evidencias de aumento de la incidencia de patógenos en polinizadores que se encuentran cercanos a invernaderos que utilizan abejorros comerciales y la comparación de las identidades genéticas de los parásitos encontrados (Colla et al. 2006; Goka et al. 2006; Cameron et al. 2011). En particular el protozoo *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly, 1974) Neogregarinida: Ophrocystidae, (anteriormente nombrado como *Mattesia bombi*) genera gran preocupación, por varias razones. En primer lugar, **su alta virulencia**; que inhibe la formación de colonias, incrementa la mortalidad de las obreras y provoca otros graves efectos físicos y de comportamiento (Schmid-Hempel 2001; Rutrecht & Brown 2008; Graystock et al. 2013). En segundo lugar, **su generalismo**; se ha registrado en las poblaciones silvestres de más de 20 especies de abejorros en Europa y Norte America y más recientemente, también en *Apis mellifera* (Lipa & Triggiani 1996; Macfarlane & Gurr 1995; Plischuk et al. 2011). En tercer lugar, su **capacidad de infectar colonias comerciales**; ha sido detectado en colonias comerciales de *B. terrestris* importados desde Irlanda y Turquía (Cankaya et al. 2006; Meeus et al. 2011; Graystock et al. 2013), con el gran peligro asociado de las dificultades para realizar controles efectivos de detección.

Se sabe que poblaciones derivadas de colonias comerciales de *B. terrestris* que fueron importadas a Chile y luego invadieron el noroeste de la Patagonia de Argentina, albergan a *A. bombi* (Plischuk et al. 2011). Sin embargo, como la distribución de este parásito parece ser amplia, es incierto si *A. bombi* se introdujo conjuntamente con *B. terrestris* a una región sin el parásito, si *A. bombi* ya estaba presente con anterioridad en especies nativas y eventualmente le fue transmitido *in situ* a *B. terrestris*, o si este patógeno ya estaba presente y *B. terrestris* sólo aportó cargas adicionales del mismo.

Hasta ahora, *A. bombi* no fue detectado en ninguno de los 441 ejemplares revisados de cinco de las ocho especies de abejorros nativas de Argentina, que habitan hacia el norte de la actual distribución de *B. terrestris* (Plischuk et al. 2009). Sin embargo, ningún análisis previo sobre este parásito se ha llevado a cabo en especies de abejorros cuya distribución se superponga con la distribución de *B. terrestris* dentro del área invadida, en particular de *B. dahlbomii* y *B. ruderatus*. El estudio a escala global del Capítulo 2 mostró una relación general entre la declinación y la ausencia de tres parásitos patógenos, y, aunque el estado sanitario de *B. dahlbomii* previo a la invasión de las especies exóticas es casi desconocido (excepto por los ectoparásitos en: Garrido & Casanueva 1995), los parásitos introducidos junto con especies de abejorros exóticos podrían presentar una patogenicidad aún mayor a la reportada para otras especies, debido a la falta de coevolución.

En este capítulo evalué la hipótesis de que este patógeno se introdujo conjuntamente con *B. terrestris*, y fue contagiado *in situ* a las especies residentes. Para ello realicé análisis moleculares (PCR) para determinar la presencia de *A. bombi* en especímenes de los abejorros recolectados antes (*B. dahlbomii* y *B. ruderatus*) y después (*B. dahlbomii*, *B. ruderatus* y *B. terrestris*) de la invasión de este último. También investigué cómo se distribuye la variabilidad genética de *A. bombi* entre regiones geográficas y especies, con el fin de determinar si las especies presentes en la Patagonia comparten los mismos haplotipos del patógeno y si éstos son también compartidos con especímenes de Europa, predicciones consistentes con la hipótesis de transferencia de patógenos por parte de *B. terrestris*.

MÉTODOS

Recolección de muestras

Analicé la presencia de *A. bombi*, en muestras de abejorros recolectados entre 1994 y 2012. Los sitios de muestreo cubrieron el gradiente de precipitaciones y los tipos de vegetación que caracterizan al NO de la Patagonia, incluyendo una variedad de sitios suburbanos y silvestres (Figura 1). Utilicé abejorros que se encontraban almacenados tanto en alcohol como secos, que pertenecían a colecciones del Laboratorio Ecotono, así como también a partir del muestreo llevado a cabo para el desarrollo del Capítulo 3 y de muestras cedidas por colegas. Las muestras se agruparon de acuerdo a dos períodos diferentes: antes y después de la invasión *B. terrestris*. Es decir, el primer período comprendió muestras de *B. dahlbomii* y *B. ruderatus* recolectadas entre 1994 y 2005, y el segundo período involucra a estas tres especies y comienza luego de la invasión de *B. terrestris*, a partir de 2006. Los tamaños de muestras variaron entre períodos y especies, debido en parte a las variaciones en los esfuerzos de muestreo y los cambios en las abundancias de las especies (Tabla 1 y Capítulo 3). Los especímenes fueron capturados en el campo durante su visita a las flores, utilizando redes o frascos de captura.

El análisis de la variabilidad genética, fue realizado en forma conjunta a través de una colaboración con la Universidad de Ghent, Bélgica (Laboratorio de Agrozoología, UGhent).

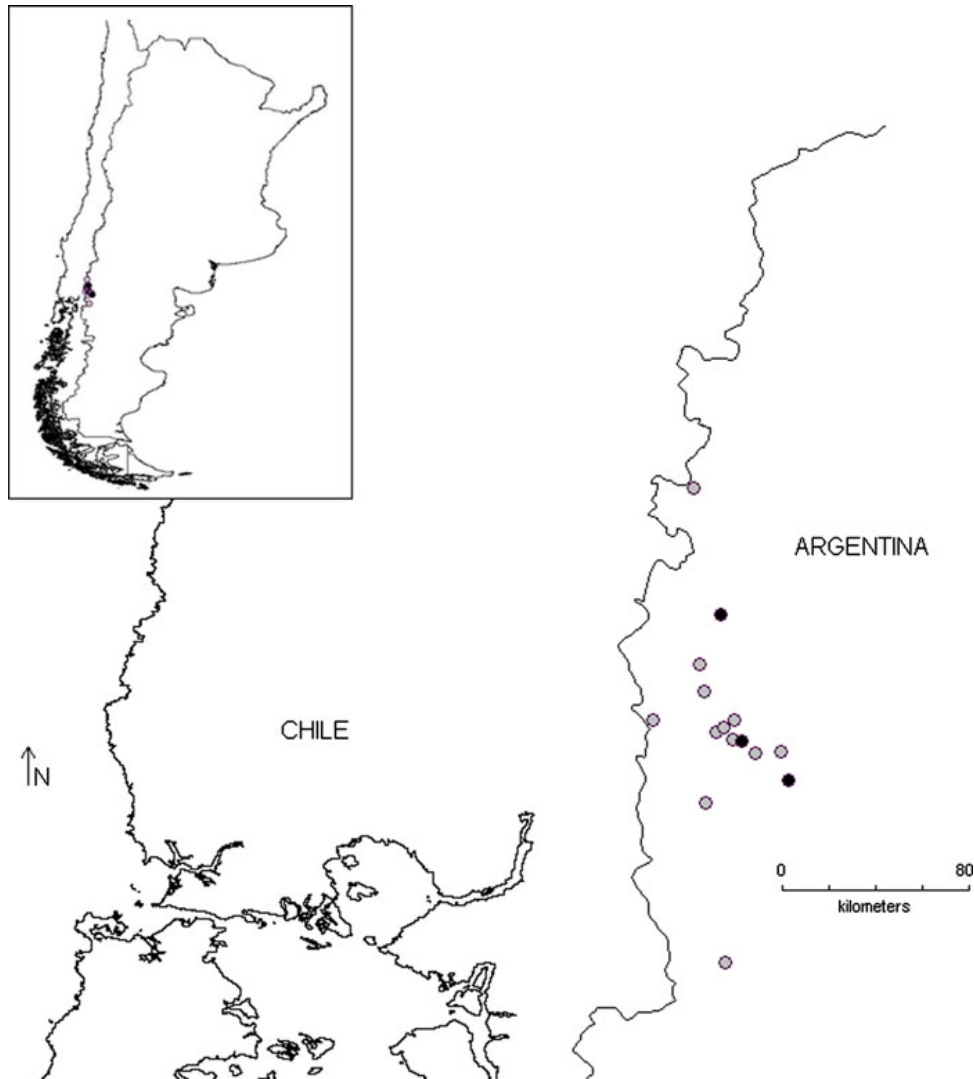


Figura 1: El mapa muestra los sitios de muestreo. Los círculos grises indican que todas las muestras fueron negativas para *Apicystis bombi*. Los círculos negros indican al menos un individuo que resultó ser positivo para el parásito luego de la invasión de *B. terrestris*.

Métodos moleculares para la detección del patógeno

Realicé la extracción de ADN utilizando kits comerciales (EZNA de Omega Bio-Tek) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Para realizar la PCR utilicé primers (NeoF y NeoR) que amplifican la subunidad pequeña del rADN(18S) de Neogregarines, siguiendo el protocolo de Meeus y col. (2010) (ver Material suplementario). Luego, siguiendo el mismo protocolo, para las muestras que fueron positivas para neogregarinos, utilicé los primers ApBF1 y ApUR2 que amplifican específicamente una región de *A. bombi* (ver Material Suplementario) junto con otro primer (en multiplex) que detecta a todos las especies de Apidae (ApidaeF y ApidaeR), como control positivo de

la extracción. Las muestras positivas, fueron limpiadas con Exo-Sap y enviadas para ser secuenciadas a LGC Genomics (Berlín, Alemania). Estos análisis los llevé a cabo en el Laboratorio de Agrozoología de la Universidad de Ghent, Bélgica.

Para las muestras que dieron resultados de baja calidad (ya sea a nivel de PCR o de secuenciación) volví a correr, amplificar y/o secuenciar las muestras en el Laboratorio Ecotono de la Universidad Nacional del Comahue, utilizando un secuenciador ABI3100-*Avant*. Las reacciones de secuenciación las realicé utilizando los reactivos químicos de BigDye v3.1 y las secuencias obtenidas en ambos lugares fueron visualizadas con el software de Sequencing Analysis 5.1, editadas con BioEdit (Hall 1999) y alineados con la herramienta CLUSTAL del Mega 6.0 (Tamura et al. 2013). Para evaluar el porcentaje de similitud entre las secuencias nuevas y las publicadas, cada muestra fue analizada con la herramienta BLAST del National Center for Biological Information (NCBI).

Métodos moleculares para determinar haplotipos de A. bombi

Para determinar los haplotipos de *A. bombi* que infectan a las distintas especies en los distintos continentes, fueron secuenciadas las regiones hipervariables del ITS1 e ITS2 del rADN. Para ello se utilizaron primers específicos (Material Suplementario) los cuales amplifican una región de aproximadamente 730 pb. El amplicón incluye el ITS1, la región 5.8S rADN y el ITS2. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25 μ L (ver detalles en Material Suplementario). Debido a que cada una de las copias puede mostrar variabilidad intraespecífica, sumado a la posible presencia de más de un parásito por hospedador, los productos de PCR fueron clonados utilizando kits comerciales (pJET1.2/blunt Cloning Vector, Fermentas UAB).

Los plásmidos fueron purificados de 10 colonias de bacterias que contenían las regiones del ITS y luego fueron secuenciados. Las secuencias fueron corregidas y editadas manualmente utilizando BioEdit y alineadas utilizando la herramienta CLUSTAL en Mega 6.06 (Tamura et al. 2013). A estas secuencias, se le sumaron las de los ejemplares de *Bombus terrestris*,

Bombus pratorum, *Apis mellifera* y *Bombus ephippiatus* provenientes de Europa y México y procesados de la misma manera en el laboratorio de Agrozoología de la Universidad de Ghent, Bélgica (Maharramov et al. 2013). Para el análisis de estos datos, se excluyeron las mutaciones que se presentaron por una única vez (probablemente debidas a errores introducidos por la polimerasa), para evitar sobreestimar la diversidad presente. Se calcularon las diferencias de mutaciones entre pares y para detectar la estructura poblacional se calcularon las variaciones dentro y entre poblaciones, usando un análisis de varianza molecular (AMOVA). Las redes de haplotipos se realizaron utilizando el programa NETWORK 4.6.1 (mediana reducida)(Bandelt et al. 1995). Estos análisis fueron realizados en cooperación con colegas del Laboratorio de Agrozoología de la Universidad de Ghent, Bélgica.

RESULTADOS

Prevalencia de parásitos pre y post invasión de B. terrestris

En total analicé 130 individuos de las tres especies de abejorros presentes en Patagonia, para la infección del parásito Neogregarine (Tabla 1) y su control de extracción (Apidae). Para cada una de las muestras positivas, una nueva PCR con primers específicos fue realizada, resultando todas las identidades genéticas un 100% iguales. Para cada especie de hospedador se depositó una secuencia en la base de datos del NCBI con los números de acceso JX268789, JX268790 y JX536492. El análisis con la herramienta BLAST confirmó la identidad de las especies al coincidir 100% con la cepa encontrada en Europa (FN546182) en *Bombus pratorum*. Antes de la invasión de *B. terrestris* encontré que todas las muestras de *B. dahlbomii* (n=52) y de *B. ruderatus* (n=30) fueron negativas para *A. bombi* (Tabla 1). En contraste, luego de la invasión, en *B. terrestris* encontré 14 especímenes infectados de los 30 analizados (47% incidencia, IC =[27.7, 55.6 %]), en *B. ruderatus* , 5 infectados de los 9 analizados (56%, IC = [23.1, 88.0 %]) y en *B. dahlbomii* 1 de los 9 analizados (11%, IC =[9.4, 31.6 %]). Dichos individuos fueron recolectados en tres sitios diferentes (Valle del Challhuaco, Lago

Moreno y Villa Traful, Fig 1, Tabla 1). Al considerar toda la fauna de abejorros preexistentes a la invasión como un conjunto (es decir todos los *B. ruderatus* y *B. dahlbomii* antes de la llegada de *B. terrestris*) el Test exacto de Fisher mostró un incremento en el porcentaje de abejorros infectados comparando los períodos pre y post invasión de *B. terrestris* (0-50% incidencia, $P < 0.0001$). Este incremento en la incidencia del parásito *A. bombi* fue significativo para *B. ruderatus* (0–56 %, $P = 0.0021$) pero no para *B. dahlbomii*, lo cual es esperable dado el bajo número de individuos disponibles para el período post invasión ($n=9$).

Año pre-invasión	Sitio	<i>B. dahlbomii</i>	<i>B. ruderatus</i>	<i>B. terrestris</i>
1994	Challhuaco	0/15	--	N/A
1995	Challhuaco	0/2	--	N/A
1998	Quetrichue	0/4	--	N/A
1999	Quetrichue	--	0/1	N/A
2000	Quetrichue	0/1	0/1	N/A
2000	Llao Llao	--	0/1	N/A
2000	Pto. Blest	0/1	--	N/A
2001	Quetrichue	0/1	0/1	N/A
2002	Los Moscos	0/4	0/3	N/A
2005	Challhuaco	0/13	0/17	N/A
2005	Llao Llao	0/11	0/6	N/A
1994-2005	Total	0/52	0/30	N/A
Año post-invasión	Sitio	<i>B. dahlbomii</i>	<i>B. ruderatus</i>	<i>B. terrestris</i>
2008	Bolsón	--	0/1	--
2008	Isla Victoria	0/1	--	--
2009	Challhuaco	--	1/1	--
2009	Lago Moreno	--	1/1	1/3
2010	Bariloche	--	--	0/1
2010	Bolsón	--	--	0/1
2010	Challhuaco	--	1/2	5/15
2010	Lago Moreno	--	0/1	8/10
2010	Los Coihues	0/1	--	--
2011	Bahía López	--	0/1	--
2011	Challhuaco	--	2/2	--

2011	Puerto Tigre	0/1	--	--
2011	Villa Traful	1/1	--	--
2012	Bolsón	0/1	--	--
2012	Colonia Suiza	0/1	--	--
2012	Llao Llao	0/1	--	--
2012	Los Coihues	0/1	--	--
2012	Río Chachín	0/1	--	--
2008-2012	Total	1/9	5/9	14/30

Tabla S1: Número de individuos analizados e infectados con *Apicystis* por sitio, año y separado por especie. N/A indica no aplicable porque no estaba presente. – indica no recolectado.

Variación intraespecífica de *Apicystis bombi*.

Todas las secuencias de la región del 18_S de *A. bombi*, independientemente del hospedador (*B. terrestris*, *B. pratorum*, *B. ruderatus* y *A. mellifera*) y recolectadas en Argentina o en Europa, fueron idénticas. Una sola mutación fue encontrada al comparar la secuencia con el parásito encontrado en el abejorro nativo de México, *Bombus ephippiatus* (KC951279).

Los resultados obtenidos para las regiones hipervariables (ITS1 e ITS2) para el set de datos completo, (n=18) mostró que 16 de las 18 muestras presentaban uno o dos haplotipos, con sólo dos individuos que incluían 3 haplotipos en el mismo hospedador. Para las especies provenientes de Patagonia (n = 9), el patrón fue similar, ya que la mayoría de los individuos (8 de los 9 analizados) contenían uno o dos haplotipos, y sólo uno tuvo 3 haplotipos (*B. terrestris*) (Tabla S1). Por lo cual, tanto a nivel general como en particular en Patagonia, se encontró poca o nula variabilidad intragenómica. Lamentablemente, no todas las muestras positivas pudieron re-amplificarse y clonarse. En particular, la única muestra de *B. dahlbomii* positiva para *A. bombi* disponible no pudo ser incluida en este análisis, debido a la baja resolución de la secuenciación.

Para conocer la variabilidad intragenómica y poder relacionarla con el origen del parásito, se trabajó con el sub-set de datos con lecturas de secuenciación confiables. Al comparar solo las muestras de Argentina (n=9) para saber si los distintos haplotipos del parásito se distribuyen entre los

hospedadores de forma homogénea o no, encontré que los dos haplotipos más comunes (de los tres encontrados) estaban presentes en las tres especies de hospedadores (*B. terrestris*, *B. ruderatus* y *A. mellifera*). El haplotipo más común (UNI) fue detectado en todas las especies recolectadas en la Patagonia, mientras que otro haplotipo se encontró en 7 de los 9 individuos. Sólo el 17,3% del total de la diversidad genética de *A. bombi* fue explicada por diferencias entre hospedadores, esto se debe a que existe un haplotipo que se encontró una sola vez en *B. terrestris* (ARG2), lo cual puede relacionarse al alto número de individuos recolectados. La mayoría de la diversidad genética fue encontrada dentro y no entre hospedadores con un 5,5% entre y un 77,2% dentro de cada individuo (Figura 2, Tabla S2).

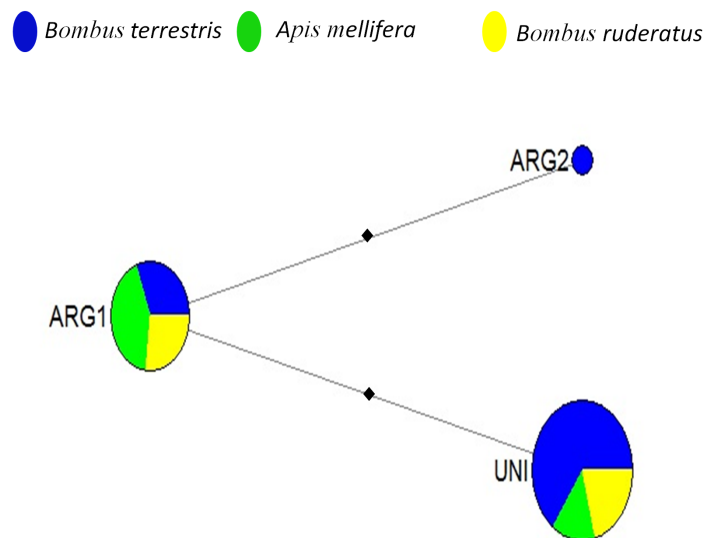


Figura 2: Abundancia y distribución de los tres haplotipos encontrados en las distintas especies de abejas analizadas de la región Patagónica. Los colores representan las especies de hospedadores y el tamaño relativo de las tortas, el número de especímenes positivos para ese haplotipos.

Al clasificar a los individuos de acuerdo a su origen geográfico, encontramos tres haplotipos en Argentina, separados por una o dos mutaciones, mientras los haplotipos europeos fueron más diversos (Figura 3). La estructura genética entre Europa y Argentina fue pequeña y no significativa (Tabla S2) y los haplotipos encontrados en Europa y Argentina (no así los de México) formaron un solo clado filogenético (Figura 4); se encontraron más haplotipos (más diversidad) en Europa que en Argentina.

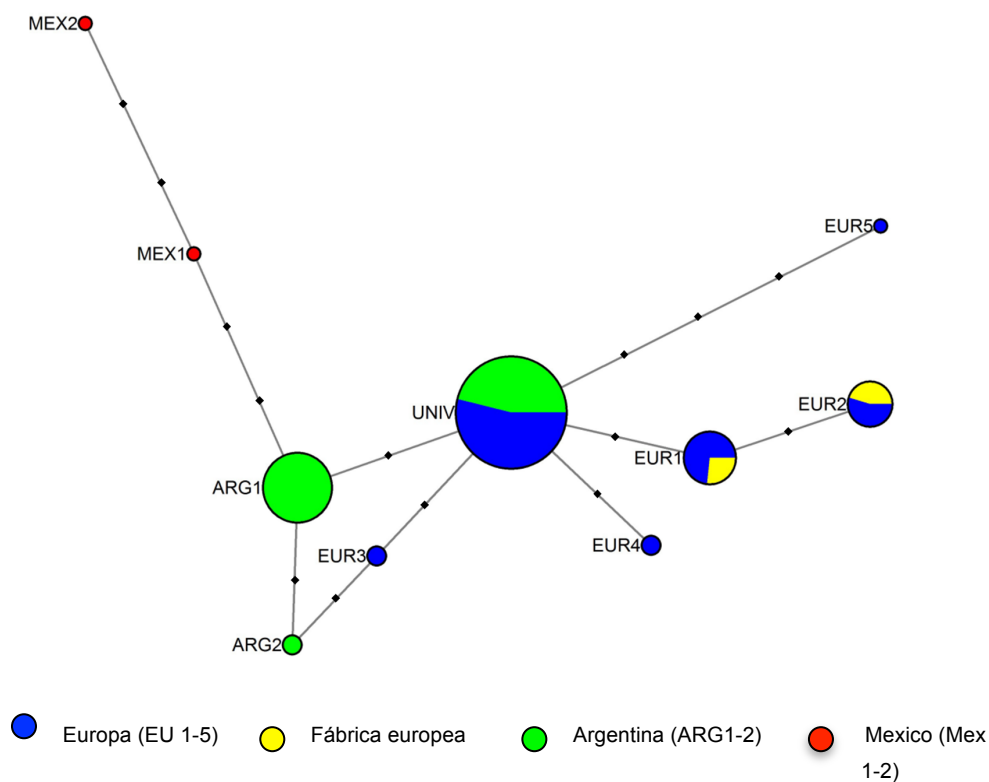


Figura 3: Cada círculo representa un haplotipo y los colores indican el origen de la muestra. El tamaño de los círculos es proporcional al número de hospedadores??de ese haplotipo. Los puntos negros indican mutaciones únicas no encontradas.

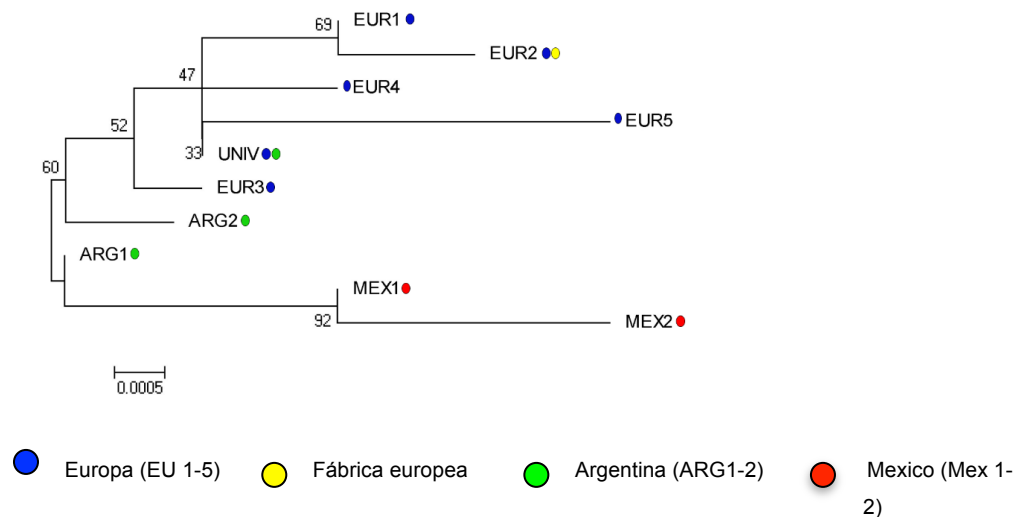


Figura 4: Relaciones evolutivas entre haplotipos encontrados en distintos hospedadores y sitios. Los números de las ramas indican los valores de bootstrap.

DISCUSIÓN

La pregunta principal que aborda este capítulo, fue si el parásito *A. bombi* detectado en poblaciones de *B. terrestris* en la Patagonia Argentina estaba presente previamente en la región o si fue introducido con esta especie invasora. Para responderla, se utilizaron dos abordajes complementarios. El primero se basó en comparar las incidencias en relación al momento de invasión de *B. terrestris*. En el segundo se exploró la distribución de los haplotipos de *A. bombi* entre las especies presentes en la región Patagonica y las regiones en donde fue encontrado el parásito.

En primer lugar, los resultados de la comparación del período anterior y posterior a la invasión de *B. terrestris*, sugieren que el NO de la región patagónica se encontraba libre de *A. bombi*, ya que no se encontraron individuos infectados (ni de *B. ruderatus* ni de *B. dahlbomii*) previamente a dicha invasión. La ausencia de *A. bombi* tanto en especies nativas de abejorros como en *A. mellifera* de individuos recolectados al norte de la distribución de *B. terrestris* en Argentina (Plischuk & Lange 2009; Plischuk et al. 2011), como en poblaciones de *B. ruderatus* que fueron naturalizadas en Nueva Zelanda y de donde provienen las poblaciones presentes hoy en día en Patagonia (Macfarlane 2005), apoyan este resultado.

La ausencia de *A. bombi* en muestras de *B. dahlbomii* y *B. ruderatus* previas a la invasión podría tener algunos inconvenientes o generar incertidumbre en el resultado obtenido. Como algunas de las muestras de *B. dahlbomii* (ya sea guardadas en alcohol como de colecciones) tenían 16 años de antigüedad, las PCR negativas podrían estar reflejando la pérdida de señal debido a la degradación del ADN del parásito (falso negativo), más que la ausencia real del parásito patógeno antes de la invasión. Si bien se obtuvieron resultados positivos en la misma amplificación por PCR para el control con la región "Apidae", se espera que la cantidad de ADN de los potenciales parásitos sea varios órdenes de magnitud menor que la del insecto hospedador. Sin embargo, los problemas asociados a la extracción de ADN son de calidad y no de cantidad ya que la PCR puede sortear esta dificultad. Además, por un lado, existen varios trabajos que muestran el éxito en la amplificación de ADN de insectos con más de 16 años de antigüedad (Frampton et al. 2008; Paulo et al. 2002; Phillips & Simon 1995). Por otro lado, muestras de 12 años de antigüedad utilizadas en este estudio amplificaron otro parásito patógeno (*Crithidia bombi*) de características similares e incluso de menor tamaño que *A. bombii* (Arbetman, datos no publicados), sugiriendo en general un buen nivel de conservación del ADN parasitario. Sumado a esto, el estudio que reporta *A. bombi* en *B. terrestris* (Plischuk & Lange 2009) reporta mayor carga parasitaria de este patógeno que de *C. bombi* para la región Patagónica. Esto sugiere, que de haber estado presente el neogregarine y en similares proporciones que las reportadas en (Plischuk & Lange 2009) el mismo sería detectable por PCR.

En este estudio se reporta por primera vez la presencia de *A. bombi* en el abejorro sudamericano *B. dahlbomii* y en el europeo *B. ruderatus*. El mismo fue detectado en estas especies luego de la invasión de *B. terrestris* y en simultaneo con la presencia de este mismo parásito en esta especie invasora. Estos resultados proveen evidencia preliminar que apoya la hipótesis de que el mismo fue co-introducido por *B. terrestris* y contagiado *in situ* a las especies residentes.

La alta prevalencia de *A. bombi* en *B. terrestris* (47%) encontrada en este estudio, triplica la reportada por Plischuk y col. en 2011 (12,1%) para la misma región. Estas diferencias pueden deberse a la distinta sensibilidad de

los métodos utilizados (molecular vs. histológico, respectivamente). La alta prevalencia encontrada en este trabajo, es mucho mayor a la reportada para esta especie en su rango nativo en Europa (1-8%) (Allen et al. 2007 y referencias allí citadas; Baer & Schmid-Hempel 2001; Liersch & Schmid-Hempel 1998), y unas nueve veces mayor que la prevalencia en otra especie, *Bombus pratorum* en su rango nativo (5,5% aprox. en Rutrecht & Brown 2008). Aunque los factores climáticos y/o ecológicos no pueden ser descartados como una explicación posible para esta alta prevalencia, muy probablemente esta diferencia se deba al hecho que *B. terrestris* es una especie comercial y que en el proceso de cría artificial exista una selección artificial para individuos resistentes (Meeus et al. 2011 ver también Capítulo 2 de esta Tesis). Las condiciones de cría intensiva podrían haber seleccionado a parásitos que puedan explotar al máximo a *B. terrestris* o a abejorros que puedan soportar los efectos letales del parásito.

En segundo lugar, se exploró la distribución de la variabilidad genética del parásito entre especies y entre regiones. Si *A. bombi* hubiera estado presente previo a la invasión en Patagonia, esperaríamos encontrar una estructuración genética por hospedador. También se esperaba encontrar dos grupos (clusters) uno por cada continente. Sin embargo, encontramos que los haplotipos forman un solo grupo y su homogeneidad genética sugiere fuertemente que los parásitos de estas dos regiones, comparten el mismo origen. Las diferencias detectadas entre los haplotipos de Europa y Argentina son de similar magnitud que las que se encuentran dentro del grupo de las europeas y es importante notar que las introducciones de abejorros exóticos provienen de diferentes regiones de Europa. Si bien los datos muestran una débil estructuración, esta no es atribuible a la separación del ancestro de los *Bombus* del Paleártico, Neártico y Neotrópico, más bien, es compatible con un origen reciente y es consistente con la hipótesis de la introducción concomitante de abejorros y parásitos. La muestra de México que mostró ser la más distinta, proporciona evidencia de que la región del ADN estudiada es lo suficientemente variable como para responder esta pregunta e identificar las diferencias a escalas espaciales, cuando estén presentes.

Si bien la sola presencia del parásito en *B. dahlbomii* y su correlación temporal con la invasión de *B. terrestris*, no permite concluir que el patógeno es el responsable del colapso poblacional, se evidencia una urgente necesidad de realizar estudios experimentales de infección que podrán proveer de herramientas para responder a esta pregunta. Sin embargo y debido a que *B. terrestris* sigue aumentando su rango de invasión, conociendo que esta especie exótica porta parásitos patógenos, y sabiendo que las introducciones continúan en nuestro país vecino, medidas sanitarias urgentes deberían adoptarse para evitar que al menos esta especie pueda tomar contacto con el resto de los *Bombus* nativos de Argentina.

Si bien sabemos que es casi imposible controlar a la especie en el terreno, quizás sea posible aprovechar las predicciones de Acosta (2016), donde muestra que hay una franja que aísla a la Patagonia de la otra región suceptible a la invasión (costa de Brasil, Uruguay y Buenos Aires). Si se implementara un sistema de alerta temprana, esto permitiría destruir los nidos que se reporten, frenado o mitigando el establecimiento de la especie invasora en esta región.

REFERENCIAS

- Acosta, A.L., et al. 2016. Worldwide alien invasion: a methodological approach to forecast the potential spread of a highly invasive pollinator. *PloS one* 11.2: e0148295.
- Allen, G.R. et al., 2007. Low parasite loads accompany the invading population of the bumblebee, *Bombus terrestris* in Tasmania. *Insectes Sociaux*, 54(1), pp.56–63.
- Baer, B. & Schmid-Hempel, P., 2001. Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution*, 55(8), pp.1639–1643.
- Bandelt, H. et al., 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics*, 141(2), p.743–753.
- Cameron, S.A. et al., 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp.1–6.
- Cankaya, N.E., Kaftanoglu, O. & Osman, K., 2006. An investigation on some diseases and parasites of bumblebee queens (*Bombus terrestris* L.) in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(7), pp.1282–1286.
- Colla, S.R. et al., 2006. Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation*, 129(4), pp.461–467.
- Frampton, M. et al., 2008. Evaluation of Specimen Preservatives for DNA Analyses of Bees. *Journal of Hymenoptera Research*, 17(2), pp.195–200.
- Garrido, C. & Casanueva, M.E., 1995. Acaros foréticos e hiperforéticos sobre *Bombus dahlbohmi* Guerin, 1835 (Hym., Apidae). *Boletín de la Sociedad de Biología*, 66, p.53–55.
- Goka, K. et al., 2001. Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*, 10(8), pp.2095–2099.
- Goka, K., Okabe, K. & Yoneda, M., 2006. Worldwide migration of parasitic mites as a result of bumblebee commercialization. *Population Ecology*, 48(4), pp.285–291.

- Goulson, D., Lye, G.C.C. & Darvill, B., 2008b. Decline and Conservation of Bumble Bees. *Annual Review of Entomology*, 53(1), pp.191–208.
- Graystock, P. et al., 2013. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *Journal of Applied Ecology*, 50(5), pp.1207–1215.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In pp. 95–98.
- Liersch, S. & Schmid-Hempel, P., 1998. Genetic variation within social insect colonies reduces parasite load. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265, pp.221–225.
- Lipa, J.J. & Triggiani, O., 1996. *Apicystis* gen nov and *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly) comb nov (Protozoa: Neogregarinida), a cosmopolitan parasite of *Bombus* and *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 27(1), pp.29–34.
- Liu, H., Macfarlane, R. & Pengelly, D., 1974. *Mattesia bombi* n. sp.(Neogregarinida: Ophrocystidae), a parasite of *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of invertebrate pathology*, 23(2), p.225–231.
- Macfarlane, R.P., 2005. Mites associated with bumble bees (*Bombus*: Apidae) in New Zealand. *Records of the Canterbury Museum*, 19, pp.29–34.
- Macfarlane, R.P. & Gurr, L., 1995. Distribution of bumble bees in New Zealand. *New Zealand Entomologist*, 18.
- Maharramov, J. et al., 2013. Genetic variability of the neogregarine *Apicystis bombi*, an etiological agent of an emergent bumblebee disease. *PLoS one*, 8(12), p.e81475.
- Meeus, I. et al., 2011. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Conservation Biology*, 25(4), pp.662–671.
- Meeus, I. et al., 2010. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), pp.107–115.
- Paulo, Ä. et al., 2002. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 16(1), pp.39–45.
- Phillips, A.J. & Simon, C., 1995. Simple, Efficient, and Nondestructive DNA

- Extraction Protocol for Arthropods. *Annals of the Entomological Society of America*, 88(3).
- Plischuk, S. et al., 2011. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), p.565–568.
- Plischuk, S. et al., 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera : Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), pp.131–135.
- Plischuk, S. & Lange, C.E., 2009. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) parasitized by a flagellate (Euglenozoa: Kinetoplastea) and a neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida). *Journal of invertebrate pathology*, 102(3), pp.263–5.
- Rutrecht, S.T. & Brown, M.J.F., 2008. The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens. *International Journal for Parasitology*, 38(7), pp.799–808.
- Schmid-Hempel, P., 2001. On the evolutionary ecology of host–parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, 88(4), pp.147–158.
- Tamura, K. et al., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. , pp.2725–2729.
- Velthuis, H. & van Doorn, A., 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4), pp.421–451.
- Williams, P.H. & Osborne, J.L., 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40(3), pp.367–387.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Hospedador	Sitio	Haplotipos									
		ARG1	ARG2	UNI	EU1	EU2	EU3	EU4	EU5	MEX1	MEX2
<i>B. terrestris</i>	Argentina	X	X	X							
<i>B. terrestris</i>	Europa			X	X	X	X	X	X		
<i>B. terrestris</i>	Europa (Col. Com)			X							
<i>B. ruderatus</i>	Argentina	X		X							
<i>B. ephippiatus</i>	Mexico									X	X
<i>A. mellifera</i>	Argentina	X		X							
<i>A. mellifera</i>	Europa										
<i>B. pratorum</i>	Europa			X	X	X	X	X			

Tabla S1: Detalle de haplotipos encontrados en distintas especies, de distintas ubicaciones geográficas. (Col. Com= colonias comerciales de *B. terrestris*). En negrita se resaltan los haplotipos encontrados en especímenes colectados en la región Patagónica.

Fuente de variación	Grados					P	F
	de libertad	Suma de cuadrados	Comp de varianza	% de varianza			
a) entre regiones (Argentina; Europa; México)	2	13,8	0,15	31,8		>0,0000	
Dentro de cada región:							
Entre individuos dentro de cada región	15	23,4	0,16	33,8		>0,0000	
Dentro de cada individuo	138	21,8	0,16	34,4		>0,0000	
b) entre hospedadores dentro de cada hospedador:	2	2,6	0,04	17,3	0,06	0,17Fct	

dentro de los individuos entre hospedadores	6	1,9	0,01	5,5	0,15	0,07F _s c
Dentro de cada individuo	2	13,4	0,2	77,2	0,005	0,22F _{st}
c) entre regiones (Argentina y Europa)	1	5,8	0,06	15,2	0,0004	0,15F _{ct}
Dentro de cada región:						
Entre individuos dentro de cada región	15	23,4	0,16	42,9	>0,0000	0,51F _s c
Dentro de cada individuo	137	20,8	0,15	41,9	>0,0000	0,58F _{st}

Tabla S2: Análisis de varianza molecular (AMOVA) donde se muestra la distribución de la variación genética de *A. bombi* en a) todos los polinizadores evaluados (agrupados según su origen geográfico); b) los individuos de Argentina (agrupados por especie de hospedador; c) Individuos de Argentina y Europa, agrupados por origen geográfico. P es la probabilidad de tener un valor más extremo en el componente del estadístico F, que los valores observados en la distribución al azar. Los estadísticos F muestran la variabilidad genética en distintos valores jerárquicos (F_{ct}, F_{sc} y F_{st})

Protocolo de PCR para detectar la presencia de *A. bombi*

La mezcla de reacción contenía 1,5 mmol l⁻¹ MgCl₂; 0,4 mmol l⁻¹, dNTP, 0,5 mmol l⁻¹ primers; 1,25 unidades de ADN Taq polimerasa (Invitrogen) y un microlitro de la muestra, con un volumen final de 25 µL.

Secuencias de primers utilizados:

NeoF: CCAGCATGGAATAACATGTAAGG

NeoR: GACAGCTTCCAATCTCTAGTCG

ApBF1: CGTACTGCCCTGAATACTCCAG

ApUR2: TTTCTCATTCTTCAGATGATTTGG

En multiplex para la detección de ADN de cualquier *Apidae* (siguiendo el protocolo de Meeus y col. 2010)

ApidaeF: AGATGGGGGCATTCGTATTG

ApidaeR: ATCTGATCGCCTTCGAACCT

Para la amplificación de la región ITS, se utilizaron primers específicos:

ApiITS732F TGGAAACAAGTCATTTTTGGAA

ApiITS732R CCTGTTCCTCGCCGTTACT

los cuales amplifican un segmento de aproximadamente 730 pb de *A. bombi* dentro del extracto de ADN del abejorro. El amplicon contiene la región ITS1 del 5.8S rADN, y la región ITS2.

Todas las reacciones de PCR fueron hechas en un volumen final de 25 µl, las cuales contuvieron:

0.2 mM dNTPs; 0.5 mM primers; 10x PCR buffer; 1.5 mM MgCl₂; 1.25 unidades de Taq polimerasa (recombinante / Invitrogen) y 1 µl templado de ADN.

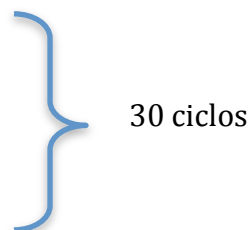
La amplificación fue realizada usando el siguiente protocolo:

94°C por 3 min (un ciclo)

95°C por 30s

55°C por 30s

72°C por 60s



una elongación final de 3 minutos.



Capítulo 5

DISCUSIÓN GENERAL



Dibujo con ceras de Ayelén Coccoz

La biodiversidad mundial se está reduciendo a una velocidad abrumadora y los polinizadores no escapan a este fenómeno (Butchart et al. 2010). Dentro de los polinizadores, las abejas (*sensu lato*) en general y los abejorros en particular, son un grupo clave ya que garantizan la reproducción de una gran variedad de especies de plantas, entre las cuales se encuentran muchos cultivos. Por lo tanto, la declinación de poblaciones de abejorros impacta directamente en los sistemas ecológicos y económicos (Potts et al. 2016). Debido a su gran importancia y a la posibilidad concreta de que esta relación mutualista planta-polinizador se vea erosionada, en esta tesis investigué la declinación de abejorros (*Bombus*) y algunas de sus potenciales causas, a distintas escalas espaciales y en distintos niveles taxonómicos. A escala global encontré una estructuración filogenética de la declinación dentro del género *Bombus* e identifiqué los subgéneros más susceptibles a la declinación. Encontré una mayor probabilidad de declinar en especies que habitan un área geográfica pequeña y en las especies en las cuales no se han reportado ninguno de tres importantes parásitos patógenos de abejorros. En cambio, a escala regional, la declinación de la especie *Bombus dahlbomii* a largo plazo se encuentra fuertemente acoplada espacial y temporalmente a la invasión de abejorros introducidos. La transmisión de parásitos patógenos de una de las especies invasoras hacia la especie nativa aparece como uno de los mecanismos subyacentes a la declinación de éste último. Si bien las causas de declinación pueden ser múltiples, interactuar y/o ser sinérgicas, la identificación de patrones generales a distintas escalas brinda herramientas para establecer estrategias de conservación adecuadas.

En el Capítulo 2 informé que hasta el momento se conoce el estatus de declinación de un 44% de las especies de abejorros, y, que de ese porcentaje, un tercio está declinando. En dicho capítulo analicé los datos por medios de técnicas de método comparado (de Villemereuil & Nakagawa 2014) y descubrí que las especies que están declinando no están distribuidas al azar en la filogenia del género; es decir, que existe una susceptibilidad diferencial entre los subgéneros. Otros autores ya habían explorado, para otros taxa, la susceptibilidad a la declinación en un marco filogenético; por ejemplo, en mamíferos y aves (Purvis et al. 2000), anfibios (Corey 2010) y plantas (Yessoufou et al. 2012). Sin embargo, hasta la fecha no se habían

realizado este tipo de análisis para el género *Bombus*. En particular, encontré una mayor proporción de especies declinando en los subgéneros *Thoracobombus*, *Cullumanobombus* y *Alpinobombus*, y una menor proporción en el subgénero *Pyrobombus*, comparada con el promedio estimado para todo el género. La estructuración filogenética en los patrones de declinación sugiere que existiría una asociación entre la susceptibilidad a la extinción y algunos rasgos compartidos por especies filogenéticamente cercanas. Sin embargo, no se encontraron señales que puedan proporcionar indicios sobre aspectos característicos de los subgéneros analizados; de hecho, la susceptibilidad a la declinación no parece estar asociada a la distribución geográfica de los subgéneros, la edad de los clados, o a la forma de alimentación de larvas, aunque todas estas variables deberían ser estudiadas en mayor profundidad.

Dado el patrón de declinación encontrado, el siguiente paso fue evaluar si las hipótesis preexistentes sobre los rasgos potencialmente asociados a la declinación de especies de abejorros explican el patrón encontrado a nivel global. Como la declinación de especies está filogenéticamente estructurada, es de esperarse que los rasgos asociados a la declinación también lo estén. Dentro de los rasgos de las especies que evalué como potenciales predictores de declinación, encontré que el tamaño del área geográfica ocupado por una especie, la longitud de la lengua y la presencia de al menos un parásito patógeno (*Crithidia bombi*, *Nosema bombi* o *Locustacharus buchneri*) tienen señal filogenética. Sin embargo, al investigar cada uno de esos parásitos por separado, ninguno mostró una señal filogenética significativa. Al aplicar regresiones filogenéticas (que controlan por la falta de independencia entre las especies dada por ancestralidad común), encontré efectos significativos y negativos en el tamaño del área geográfica y en la ausencia de parásitos sobre la probabilidad de declinación de las especies. Por otro lado, no encontré ningún efecto de la longitud de la lengua en la declinación.

El tamaño del área geográfica ha sido señalado en otros taxa (e. g. para murciélagos y anfibios Jones et al. 2003; Sodhi et al. 2008) como un rasgo intrínseco de las especies que podría influir sobre su supervivencia. Así, los resultados de esta tesis se suman a la creciente evidencia en apoyo

de la importancia que posee la amplitud del área de distribución, para la supervivencia de las especies en general. Se espera que las especies con distribuciones geográficas más amplias tengan mayores tamaños efectivos de población y/o también mayor variabilidad genética, y que puedan habitar ambientes ecológicos más diversos. Estas características serían el reflejo de una mayor amplitud de nicho de las especies con rango de distribución amplias, característica que otorgaría una mayor resiliencia ante los cambios globales tanto en términos de clima como de uso de la tierra.

Fue interesante encontrar que a nivel global el largo de la lengua de las especies no predijo la susceptibilidad a la declinación. ¿Qué significa este resultado entonces? Mi hipótesis inicial planteaba primero, que existe una fuerte relación entre el largo de la lengua y el grado de especialización en la utilización del recurso floral y segundo, que las especies que sean más especialistas en la utilización del recurso podrían ser más susceptibles al cambio en el uso de la tierra (ya que hay un cambio hacia una baja variabilidad en los recursos florales y en grandes áreas cultivadas), entonces éstas serían más propensas a la declinación.

Como mis resultados no apoyan mi hipótesis inicial, dado que no encontré ninguna relación entre la longitud de la lengua y las probabilidades de declinar, se podría pensar que o bien el largo de la lengua no es un buen predictor de la especialización en el recurso, o que aún existiendo una relación entre largo de lengua y especialización trófica, éste no estuviera relacionado con la declinación.

Otro escenario posible, sería que existiera el patrón anterior de especialización, pero a nivel local, no escalable a un patrón mundial. Si bien yo no puse a prueba esta hipótesis, mis resultados no descartan esta posibilidad.

En contraste con los escenarios anteriores, podría darse el caso de la plasticidad en el uso del recurso (especialización o generalización en determinado contexto de disponibilidad de recursos) como por ejemplo muestra un trabajo en un gradiente ambiental (Miller-Struttman, & Galen, 2014). También podría existir plasticidad en el largo de la lengua a nivel especie, acoplado a un cambio en la disponibilidad de un recurso específico que ya no se encuentre disponible (en un tiempo histórico) como muestra otro

trabajo de Miller-Strutmann y colaboradores del 2015. Por lo tanto, sería interesante seguir profundizando en estos nuevos escenarios.

La susceptibilidad a la declinación fue mayor en aquellas especies en donde ninguno de los patógenos investigados en combinación (*C. bombi*, *N. bombi* y *L. buchneri*) fue detectado. Este patrón podría explicarse por el mecanismo de tolerancia con los patógenos altamente letales actuando como filtros ecológicos. Si los abejorros que se infectan mueren (o sea que carecen del mecanismo de tolerancia), sólo los individuos que eviten la infección (resistentes) sobrevivirán estando libres de patógenos pero reduciéndose de esta manera, la posibilidad de detectar estos parásitos en individuos adultos. En este caso una menor incidencia del patógeno sería un reflejo de una reducción del tamaño poblacional y en consecuencia mayor probabilidad de extinción. En línea con esta idea, en el Capítulo 4 mostré cómo el patógeno *Apicystis bombi* co-introducido junto con *B. terrestris* tuvo una prevalencia más alta en las especies invasoras al compararla con la del abejorro nativo, *B. dahlbomii* (Arbetman et al. 2013). La hipótesis de tolerancia como mecanismo que explica los resultados obtenidos se deriva, sin embargo, de la observación de un patrón. De todas maneras y sin lugar a duda, se necesitan más estudios para esclarecer el significado de la asociación entre ausencia de parásitos y la declinación. Sería interesante en el futuro realizar estudios experimentales que evalúen esta hipótesis, sometiendo a especies en las que se han detectado y a especies en las que no se han detectado estos patógenos a infecciones dirigidas en laboratorio y se evalúe su supervivencia.

Dentro del subgénero *Thoracobombus* casi dos tercios de las especies están declinando global o continentalmente, determinando que este es un clado susceptible donde declinaciones de otras especies sería esperable. Apoyando esta hipótesis, poblaciones de otras seis especies de este subgénero (no incluidas en las que declinan) tienen una clara tendencia a la declinación, aunque todavía no califican para ser listadas dentro de alguna de las categorías de riesgo de la UICN. Además, recientemente se ha sugerido que *B. rubriventris*, la cual pertenece a este subgénero, estaría cercana a la extinción (Williams 2015). Es interesante notar que, por el contrario, el subgénero *Pyrobombus*, fue el menos propenso a la declinación

con especies muy diversas tanto en su morfología, (e.g. largo de la lengua y venación de las alas: Lutz 1916; Medler 1962; Richards 1968) como en su preferencia para construir su nido y el momento en el que emergen las reinas (Sakagami et al. 1967). Las especies de este subgénero están ampliamente distribuidas en una variedad de hábitats; por ejemplo, en Norteamérica se encuentran tanto en el desierto como en la tundra del ártico. Si bien su gran variabilidad llevó a que el origen monofilético del mismo haya sido cuestionado (Medler 1962), el mismo ha sido ratificado por estudios más recientes (Pedersen 2002; Kawakita et al. 2004; Hines et al. 2006). En consecuencia, se esperaría que existan rasgos subyacentes que caractericen a este subgénero y que estén relacionados con la capacidad de sus especies de mantenerse estables, en diversos ecosistemas frente a distintas amenazas. Es probable entonces que, “el rasgo” que hace persistente a este subgénero no sea una variable en sí misma (e. g. el largo de la lengua) sino la plasticidad fenotípica de dicha variable.

Los dos subgéneros de abejorros presentes en Argentina, (*Cullumanobombus* y *Thoracobombus*) están incluidos en el grupo de los subgéneros que declinan más que el promedio, con la especie más austral del mundo, *B. dahlbomii*, la especie protagonista de esta tesis, perteneciente a ese último. En relación con la conservación de esta especie endémica de abejorro, a escala regional documento tanto la extensión como la velocidad de la invasión en el sur de Argentina de dos especies de abejorros introducidos, *B. ruderatus* y *B. terrestris*. En particular, en el Capítulo 3 demuestro que *B. terrestris* ha reemplazado ecológicamente no sólo a la especie nativa *B. dahlbomii* sino también a *B. ruderatus*, siendo hoy en día la especie más abundante. Además, el avance hacia el sur del frente de invasión de *B. ruderatus*, y particularmente de *B. terrestris*, más allá de las distribuciones más recientes reportadas (Montalva y col. 2011) sugieren una de las mayores velocidades de expansión para insectos sociales invasores. De hecho, desde que realicé los muestreos en los que se basa el Capítulo 3 (i.e. el verano de 2011), a la fecha, el avance de *B. terrestris* ha sido mucho mayor, llegando ya a Puerto Williams, en la Isla Navarino en el Cabo de Hornos, compitiendo entonces con la especie nativa por ser la especie más austral del mundo (Montalva com. pers).

El colapso dramático de las poblaciones de *B. dahlbomii* se observó tanto a escala espacial como temporal, y es coincidente con la propagación de las dos especies de abejorros invasores. Aunque los resultados sean de naturaleza correlativa, sugieren que la fuerte retracción de la distribución histórica de *B. dahlbomii* está asociada a la invasión de abejorros introducidos. Como se mencionó anteriormente, este estudio se llevó a cabo principalmente en parques nacionales o en áreas que carecen de agricultura intensiva y/o grandes asentamientos urbanos con lo cual, los efectos del cambio en el uso de la tierra no serían los responsables primarios de la declinación. Sin embargo, incluso en los Parques Nacionales hoy en día existen plantas exóticas invasoras que podrían estar jugando un papel indirecto promoviendo el aumento de la abundancia de abejorros exóticos invasores. Por último, la alarmante velocidad de reemplazo de *B. dahlbomii* por *B. terrestris* demostrada en el Capítulo 3 complica o inhibe una potencial restauración de las poblaciones del abejorro nativo, impactando además directamente en la flora polinizada originalmente por el abejorro nativo (Graham, Tesis de Licenciatura 2015) y en los cultivos (Sáez et al. 2014).

Luego de documentar el patrón de declinación de largo plazo y de largo alcance, evalué en el Capítulo 4 uno de los mecanismos hipotizados en explicar la declinación de la especie nativa (*B. dahlbomii*) debido a la invasión de las especies introducidas (*B. ruderatus* y *B. terrestris*): la introducción de patógenos nuevos. Específicamente investigué si el patógeno que infecta a poblaciones de *B. terrestris* en el NO de la Patagonia, *Apicystis bombi* (Plischuk et al. 2011), había sido co-introducido con esta especie y contagiando a la especie nativa. Debido a que encontré que las especies que estaban presentes en Patagonia (*B. ruderatus* y *B. dahlbomii*) previo a la llegada de *B. terrestris* no albergaban al parásito *A. bombi*, en contraste con el resultado de todas las especies de abejorros infectadas luego de la invasión (*B. dahlbomii*, *B. ruderatus* y *B. terrestris*), la hipótesis de transmisión de parásitos patógenos mediada por *B. terrestris* no pudo ser descartada. Reforzando este resultado encontré que los abejorros exóticos de Patagonia comparten los distintos haplotipos encontrados (o sea no hay una especificidad por especie), y que estos son los mismos aquí y en Europa (es decir que no hay una estructuración geográfica). Sin embargo, los

métodos moleculares utilizados no permitieron establecer la direccionalidad de la transmisión. ¿Fueron los parásitos desde la Patagonia hacia Europa, o lo hicieron en sentido contrario? Al encontrar que los haplotipos son compartidos y al no encontrarse dicho parásito previo a la invasión (con una detección temporal coincidente con la llegada de *B. terrestris*), toda la evidencia disponible le da soporte a la hipótesis de un origen europeo y una co-introducción en Patagonia, junto con *B. terrestris*.

Encontrar que una especie invasora transmitió un parásito, que además está reportado para especies del mismo género como altamente patogénico, no es suficiente evidencia para determinar que ésa sea la causa de la declinación de la especie nativa. Sin embargo, sí pone en evidencia una urgente necesidad de ahondar en estudios que provean de herramientas para descartar (o no) esta hipótesis, y también estimula futuras líneas de investigación en este sentido. Además, aunque este parásito en particular sea o no la causa principal de la declinación del abejorro nativo, sí corrobora que la transmisión de patógenos de especies de abejorros introducidas a nativas es un hecho. Como *B. dahlbomii* pertenece a un subgénero susceptible de declinación y la prevalencia de *A. bombi* en esta especie fue mucho menor al compararla con la prevalencia en *B. ruderatus* y en *B. terrestris* para la misma región, estos resultados son consistentes con la hipótesis de menor tolerancia en el mecanismo de defensa a patógenos en *B. dahlbomii*. Debido a que *B. terrestris* sigue expandiendo su área de invasión y sabiendo que las especies nativas del resto de Argentina estarían aparentemente libres de dicho patógeno, medidas urgentes deben ser adoptadas para evitar un eventual contagio. En primer lugar, se debería lograr que las autoridades de Chile impidieran o restringieran nuevas introducciones, ya que ninguna medida puede ser efectiva en el contexto actual, con una introducción anual promedio de más de 15.000 colonias (Fuente: SAG de Chile, fecha de acceso: 14 June 2016 y IUCN *B. dahlbomii* Redlist). Una vez que esto se haga efectivo, otras medidas que mitiguen su impacto, por ejemplo la reducción de flora exótica para evitar esta interacción facilitadora, junto con medidas destinadas específicamente a la remoción de *B. terrestris* podrán ser evaluadas (e. g. producción de machos estériles).

El comercio internacional de abejorros para la polinización de cultivos implica el transporte y establecimiento de colonias de especies o subespecies no nativas. A pesar de las graves preocupaciones sobre el impacto ecológico del uso de abejorros no nativos (Dafni et al. 2010; Dafni & Shmida 1996; Widmer et al. 1998; Goka et al. 2001; Ings et al. 2006; Arbetman et al. 2013; Morales 2007) la importación de abejorros comerciales continúa a gran escala y en muchos países (e. g. Chile, Corea del Sur, y en Europa). En consecuencia, es necesario establecer primero la necesidad real de aumentar el número o el tipo de polinizador (si existe o no limitación polínica) y, de ser así, buscar alternativas más sustentables a largo plazo.

El estado de declinación de muchas de las especies del género *Bombus* aún no ha sido evaluado y esto es notable en particular en Asia, en donde se encuentran casi el 50% de las especies. Aunque con una fauna mucho menor, también en Sudamérica faltan datos para evaluar muchas especies (más del 65%) ya que muchas están categorizadas como deficientes de datos (DD). En Argentina habitan ocho especies nativas de *Bombus*, pertenecientes a los subgéneros *Thoracobombus* y *Cullumanobombus*, es decir dos de los subgéneros con mayor probabilidad de encontrar especies susceptibles a declinar. De estas ocho especies, cuatro están categorizadas como de menor preocupación "LC" (*Bombus pauloensis* Friese, 1913 (= *Bombus atratus* Franklin, 1913), *B. baeri*, *B. morio* y *B. opifex*) y otras tres categorizadas como de "datos deficientes "DD" (*B. bellicosus*, *B. brasiliensis* y *B. tucumanus*). Recientemente, en parte en base a los resultados de esta tesis y de estudios previos de mis directores y otros grupos de investigación, la especie *B. dahlbomii* ha sido categorizada en peligro "EN" (IUCN), proceso de evaluación en el que participé activamente como miembro del grupo de especialistas en abejorros de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (conocido por sus siglas en inglés, BBSG-IUCN).

Frente a la disminución en todo el mundo de los polinizadores (Kearns et al. 1998; Steffan-Dewenter et al. 2005), incluyendo a los abejorros (Sarospataki, Novak y Molnar 2005; Williams 2005) es necesario establecer estrategias de conservación adecuadas. Este estudio pretende brindar un aporte para diseñar estrategias de conservación. A escala global, se

recomienda para los planes y estrategias de conservación tener en cuenta las diferencias en susceptibilidad a la declinación de los diferentes subgéneros. Además, se sugiere conservar los hábitats de las especies para que éstas puedan enfrentar los actuales desafíos de cambio global, y continuar con los estudios referentes a las estrategias relacionadas con las defensas a los patógenos. La introducción de especies no nativas, ya sea intencional o accidental, es un importante componente del cambio global (Vitousek et al. 1997) y que en el caso de la introducción de abejorros se complejiza, ya que los polinizadores son considerados organismos beneficiosos (Goulson 2003; Moritz et al. 2005). La introducción de polinizadores no nativos implica numerosos riesgos, incluyendo: interferencia en las interacciones planta-polinizador y en el servicio de polinización, competencia con especies nativas, perturbación reproductiva y potencial hibridación y transmisión de parásitos (Goulson 2003; Stout et al. 2009; Morales 2007) siendo considerada esta última amenaza, una de las más serias actualmente (Goulson & Hughes 2015).

Debido a toda la evidencia científica acumulada, el grupo de especialistas en abejorros (IUCN BBSG) recomienda:

IUCN BSG Declaración sobre el tráfico comercial

*El comercio global de colonias de abejorros para polinización de cultivos, más notablemente de las especie europea *Bombus terrestris* y norteamericana *Bombus impatiens*, han resultado en el establecimiento de especies de abejorros lejos de sus áreas de distribución natural, por ejemplo en Japón, partes de Australasia, Chile y Argentina. Las especies de abejorros no nativas invasoras plantean múltiples riesgos para las especies nativas, incluyendo: competencia, hibridación que resulta en pérdida de eco-tipos adaptados localmente, y la introducción de enfermedades de abejas no nativas. Existe evidencia de que parásitos de abejorros comerciales pueden haber sido introducidos o diseminados irreversiblemente en Japón, Norteamérica y Sudamérica, con impactos potencialmente profundos en abejorros nativos.*

La IUCN BBSG (Grupo de especialistas en Abejorros de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) considera que el movimiento comercial y uso de abejorros para polinización deben ser gobernados por el principio precautorio para prevenir daños no intencionales. Sólo especies y subespecies de abejorros locales deben ser criadas para desarrollo comercial y empleadas dentro de sus áreas de distribución nativas. Todos los abejorros comerciales deben ser cuidadosamente monitoreados en busca de parásitos tanto por los productores como por organismos reguladores independientes. Si los abejorros comerciales son utilizados en campos abiertos, como alternativa o como complemento al manejo del hábitat tendiente a sustentar a las comunidades de polinizadores silvestres, sólo especies nativas (o subespecies geográficamente apropiadas) de abejorros comerciales deben ser usadas. Todo uso en invernaderos debe ser controlado para eliminar el riesgo de escape.

En consecuencia, dado los resultados de los estudios incluídos en esta tesis, y en consonancia con las expresadas por el grupo de especialistas en abejorros se recomienda, tanto a nivel global como local:

- Promover la diversidad de polinizadores silvestres en los cultivos, para proveer un buen servicio de polinización sin necesidad de introducir polinizadores manejados.
- No permitir la importación de especies exóticas (y menos si son invasoras).
- Sólo si fuera necesario, al introducir polinizadores criados, promover/alentar que sean nativos de la región y controlar exhaustivamente su estado sanitario.
- Establecer mecanismos rigurosos de sanidad en las factorías de abejorros y en los sitios de utilización.
- Fortalecer el vínculo con las autoridades nacionales para discutir la problemática de los productores y trabajar en conjunto para evitar la

importación de cualquier polinizador exótico, generando herramientas alternativas con sustento científico.

Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, se han iniciado relaciones con el gobierno de Chile (específicamente con el Servicio de Agricultura ya Ganadería, SAG) para informar y dialogar sobre las consecuencias de las importaciones de polinizadores exóticos. Se deberán continuar las gestiones para coordinar acciones en conjunto entre ambos países, dado que anualmente son miles las colonias de *B. terrestris* que ingresan a Chile, en una suerte de invasión subsidiada por los productores. Cualquier programa de restauración de la especie nativa, requiere de una prohibición de importación en el país vecino, ya que queda aquí demostrado como los abejorros invasores afectaron y continúan afectando a nuestro país.

REFERENCIAS

- Arbetman, M.P. et al., 2013. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biological Invasions*, 15(3), pp.489–494.
- Butchart, S.H.M. et al., 2010. Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328(5982), pp.1164–1168.
- Corey, S.J., 2010. Phylogenetic Signal of Threatening Processes among Hylids: The Need for Clade-Level Conservation Planning. *Diversity*, 2(2), pp.142–162.
- Dafni, A. et al., 2010. *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45(1), pp.101–113.
- Dafni, A. & Shmida, A., 1996. The possible ecological implications of the invasion of *Bombus terrestris* (L.) (Apidae) at Mt Carmel, Israel. In A. Matheson et al., eds. *The Conservation of Bees*. Academic Press, pp. 183–200.
- Goka, K. et al., 2001. Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*, 10(8), pp.2095–2099.
- Goulson, D., 2003. Effects of Introduced Bees on Native Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, pp.1–26.
- Goulson, D. & Hughes, W.O.H., 2015. Mitigating the anthropogenic spread of bee parasites to protect wild pollinators. *Biological Conservation*, 191(July), pp.10–19.
- Hines, H.M., Cameron, S.A. & Williams, P.H., 2006. Molecular phylogeny of the bumble bee subgenus *Pyrobombus* (Hymenoptera : Apidae : *Bombus*) with insights into gene utility for lower-level analysis. *Invertebrate Systematics*, 20(3), pp.289–303.
- Ings, T.C., Ward, N.L. & Chittka, L., 2006. Can commercially imported bumble bees out-compete their native conspecifics? *Journal of Applied Ecology*, 43(5), pp.940–948.
- Jones, K.E., Purvis, A. & Gittleman, J.L., 2003. Biological Correlates of Extinction Risk in Bats. *The American Naturalist*, 161(4), pp.601–614.

- Kawakita, A. et al., 2004. Phylogeny, historical biogeography, and character evolution in bumble bees (*Bombus*: Apidae) based on simultaneous analysis of three nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(2), pp.799–804.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W. & Waser, N.M., 1998. Endangered Mutualisms: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions The Conservation of Plant-Pollinator Interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 29(29), pp.83–112.
- Lutz, F.E. 1879-1943., 1916. The geographic distribution of Bombidae (Hymenoptera), with notes on certain species of boreal America. *Bulletin of the AMNH* ; v. 35, article 26.
- Medler, J.T., 1962. Morphometric Studies on Bumble Bees. *Annals of the Entomological Society of America*, 55(2).
- Miller-Struttman, N.E. et al., 2015. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science*, 78(2010), pp.75–78.
- Miller-Struttman, N.E., & Galen, C., 2014. High-altitude multi-taskers: bumble bee food plant use broadens along an altitudinal productivity gradient. *Oecologia* 176(4): 1033-1045.
- Montalva, J. et al., 2011. Geographic distribution and associated flora of native and introduced bumble bees (*Bombus* spp.) in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 50(1), pp.11–21.
- Morales, C.L., 2007. Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecología Austral*, 17, pp.51–65.
- Moritz, R.F.A., Härtel, S. & Neumann, P., 2005. Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Écoscience*, 12(3), pp.289–301.
- Pedersen, V., 2002. European bumblebees (Hymenoptera: Bombini)-phylogenetic relationships inferred from DNA sequences. *Insect Systematics & Evolution*, 33(4), pp.361–386.
- Plischuk, S. et al., 2011. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera):

- Apidae) in Argentina. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), p.565–568.
- Potts, S.G. et al., 2016. *IPBES: Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production.*
- Purvis, A. et al., 2000. Predicting extinction risk in declining species. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 267, pp.1947–1952.
- Richards, O.W., 1968. The subgeneric division of the genus *Bombus* Latreille (Hymenoptera: Apidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology*, 22, pp.209–276.
- Sáez, A. et al., 2014. Extremely frequent bee visits increase pollen deposition but reduce drupelet set in raspberry I. Steffan-Dewenter, ed. *Journal of Applied Ecology*, 51(6), pp.1603–1612.
- Sakagami, S.F., Akahira, Y. & Zucchi, R., 1967. Nest architecture and brood development in a neotropical bumblebee, *Bombus atratus*. *Insectes Sociaux*, 14(4), pp.389–413.
- Sodhi, N.S. et al., 2008. Measuring the Meltdown: Drivers of Global Amphibian Extinction and Decline R. Freckleton, ed. *PLoS ONE*, 3(2), p.e1636.
- Steffan-Dewenter, I. et al., 2005. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(12), pp.651–653.
- Stout, J.C. et al., 2009. Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*, 40(3), pp.388–409.
- de Villemereuil, P. & Nakagawa, S., 2014. *Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology: Concepts and Practice* L. Z. Garamszegi, ed., Spain.
- Vitousek, P.M. et al., 1997. Introduced Species: a Significant Component of Human-Caused Global Change. *New Zealand Journal of Ecology*, 21(1), pp.1–16.
- Widmer, A. et al., 1998. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. *Heredity*, 81(5), pp.563–572.
- Williams, P.H., 2015. *Bombus rubriventris* : type locality, different histories of bumblebees in the New World, and a likely invertebrate extinction.

- Journal of Natural History*, 49(19–20), pp.1159–1171.
- Williams, P.H., 2005. Does specialization explain rarity and decline among British bumblebees? A response to Goulson et al. *Biological Conservation*, 122(1), pp.33–43.
- Yessoufou, K., Daru, B.H. & Davies, T.J., 2012. Phylogenetic Patterns of Extinction Risk in the Eastern Arc Ecosystems, an African Biodiversity Hotspot S. Lavergne, ed. *PLoS ONE*, 7(10), p.e47082.

Agradecimientos

Y llegó el momento... es muy emocionante terminar esta etapa y no quisiera olvidarme de ninguna de las tantas personas que hicieron que yo esté ahora disfrutando de este momento!!

Si bien esta tesis es la culminación de una actividad académica, de ninguna manera podría haberse realizado sin ayuda y apoyo de gente que nada tiene que ver con la ciencia. Entonces:

A Jazmín, Werny y Rocco. Por tanto amor, tanto aguante y por la compañía y el apoyo minuto a minuto!

A mi papá, a mi mamá y a mi hermano, por toda la vida compartida.

Al Tío Daniel, Tío Hugo, y Ani, a Anga, Mija, Tomas, Lore, Aike, Sebastián y Gaby y a Tobi, Iru, Boris y Alelí.

A Lucha, Marian, Jopy y todas mis amigas, amigos y compañeras de hockey, que tanto miraron y miraron abejorros en cada una de las giras!

A mis amigas que están lejos, pero siempre están! Ceci Carrea, Mayra Caldiz, Vero Sympson, Jimena Murúa, Ayelén Cocoz y Cris Acosta.

A Mary Gaitán y a Baru!!

A Andrés Raviolo y Manuela Pardo por el aguante permanente y toda la buena onda.

Mi madrina brasileña Nair Campos que me recibió como familia sin conocerme.

Y en particular a los que no sólo me apoyaron emocionalmente sino que directamente permitieron que esta tesis exista.

A Carolina Morales. Directora y amiga. Una persona maravillosa en todo sentido que me acompaña, me incentiva y me ayuda a crecer y a formarme como persona-investigadora.

A Marcelo Aizen, por su amistad y por tanta generosidad científica y humana y por apoyarme todo el tiempo. Gracias por generar este grupo con el que disfruto tanto trabajar día a día.

A la Universidad del Comahue y de Río Negro y a todas las Universidades Nacionales y a la educación pública de nuestro país.

A los jurados y a la Comisión de Doctorado que hacen un trabajo enorme y desinteresado.

A todo el grupo de polinización: Gaby Gleiser, Agustín Sáez, Marina Strelin y Vani Chalcoff por tanto tanto aguante.

A Vic Werenkraut, Moni de Torres Curth y Gaby Gleiser por tantos y tan buenos ratos de amistad y catarsis de ciencia.

A las chicas de genética en especial a Andy que me bancó cuando me “caía” de este sistema, a Paulita Mathiasen, Paula Quiroga, Cin Souto y Mariana Fasanella, que me acompañaron y ayudaron a llegar hasta el día de hoy!

A todos mis compañeros de Ecotono, con los cuales compartimos mucho más que cuestiones científicas y que me hicieron un aguante total en estas últimas semanas que parecían no pasar! En particular a Agustina Di Virgilio, Mary Tadey, Romina Vidal-Russell, Adriana Ruggiero, Jenny Landesman, Ramiro Ripa y al tip-top de Edu Zattara, a Paco Uzal y a Sebastián Márquez.

A todos los colaboradores internacionales: Ivan Meeus y Guy Smagghe que me abrieron las puertas del laboratorio en Bélgica y a Sydney Cameron, Paul Williams y Dave Goulson, Cecilia Smith-Ramirez, Lorena Viali y Rodrigo Barahona, con los que compartí hermosos momentos/muestreos y que compartieron todos sus saberes. A Josefin Madjidian, con la cual inicié mi curiosidad por los abejorros.

A Anete Pereira de Souza y todo su equipo del Laboratorio del CEBMEG. En particular a Danilo y a Gustavo y a Eline Martins.

A toda la gente de Parques Nacionales con los que interactué durante estos años, en particular a Felix Vidoz, Ceci Nuñez, Laura Malmierca, Mónica Mermoz.

Al Amariyo por haber apoyado el intercambio de Fulbright.

A todos los que colectaron y compartieron muestras: Marta y Edu Bagur, Marina Zorzoli, Chaco, Maureen Murúa, Yamila Sasal, Arturo Roig Alsina y Felix Vidoz y Cecilia Li Puma del Ministerio de Medio Ambiente

Los equipos de proyectos de extensión, (Moni, Caro y Manu y todos los estudiantes que nos acompañaron y a Gusti, Ana, Meli, Jor, Moni y Anita) por haberme permitido formar parte de grupos que quieren aportar un granito de arena a la sociedad.

A los proyectos de investigación que solventaron la inversión en este trabajo: PICT, PI-UNRN y Fundación Rufford

Y seguramente se me escapa más de uno, que en este momento de nerviosismo y felicidad total me cuesta (más que lo habitual) recordar.
A todos más que GRACIAS...