



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Influencia de la polinización por abejas
sobre la producción y características de
frutos y semillas de *Vaccinium
meridionale* Sw. (Ericaceae) en los Andes
Orientales de Colombia**

Fermín José Chamorro García

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, D.C., Colombia

2014

Influencia de la polinización por abejas sobre la producción y características de frutos y semillas de *Vaccinium meridionale* Sw. (Ericaceae) en los Andes Orientales de Colombia

Fermín José Chamorro García

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Biología

Directora:

MSc. Guiomar Nates Parra, Profesora Titular

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Investigaciones en Abejas-LABUN

Línea de Investigación:

Abejas y polinización en Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, D.C., Colombia

2014

Agradecimientos

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias y la Universidad Nacional que financiaron parte de este a través del proyecto de investigación “Valoración de los servicios de polinización por abejas en algunos frutales promisorios de Colombia (Contrato 389-2011).

A la profesora Guiomar Nates Parra, por su dirección, tutoría y orientación y especialmente por darme la oportunidad de continuar aprendiendo sobre las abejas y su importancia ecológica y económica.

A la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) que financió el desarrollo de los experimentos del segundo capítulo de estas tesis (Contrato a G. Nates-Parra).

Al equipo de investigación del LABUN (estudiantes e investigadores) que colaboraron en el trabajo de campo: Ángela Rodríguez, Laura Calderón, Simón Pinilla, Daniela León, Paula Montoya, Mónica Henao.

Resumen

El agraz (*Vaccinium meridionale*, Ericaceae), es un cultivo promisorio en la zona altoandina de Colombia, sin embargo no se conocen muchos aspectos relacionados con su polinización, lo cual es fundamental para su manejo porque así se podrá propagar de manera óptima en las diferentes regiones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la importancia de la polinización por abejas en la reproducción del agraz, para lo cual se realizaron experimentos de biología floral, biología reproductiva, eficiencia de polinización y se evaluó el efecto de la presencia de colmenas de *Apis mellifera* sobre la fructificación del agraz. El estudio se realizó con poblaciones silvestres de agraz en la Cordillera Oriental. Se encontró que el agraz presenta un sistema reproductivo mixto, produce frutos por agamospermia, autogamia y entrecruzamiento. No obstante, la especie busca promover el entrecruzamiento, dado que presentó rasgos florales para atraer un amplio grupo de polinizadores (anteras poricidas con fácil liberación de polen, sesgo en la producción de néctar hacia la función femenina, gran despliegue floral, larga longevidad floral) y una fuerte depresión por endogamia. *Apis mellifera* y las diferentes castas (obrero, macho y reina) de *Bombus hortulanus* son polinizadores eficientes del agraz y la presencia de colmenas no aumentó la producción de frutos pero sí contribuyó a aumentar la retención de frutos por polinización cruzada. Las abejas son fundamentales para el manejo del agraz tanto en términos de conservación como producción porque a través de la polinización cruzada pueden contribuir al mantenimiento de la variabilidad genética de las poblaciones y a que obtengan una buena producción de frutos, la cual puede disminuir si hay altas tasas de autogamia.

Palabras clave: Apicultura, *Apis mellifera*, *Bombus hortulanus*, Bosques de roble, Cultivos promisorios, Depresión por endogamia, Eficiencia de polinización.

Abstract

Vaccinium meridionale (Ericaceae), known as “agraz” is a promising crop in the Andean highlands of Colombia. However, the information about its pollination biology is scarce, which is essential for an optimal breeding program. The aim of this study was to evaluate the importance of bee pollination on reproduction of *V. meridionale*. For this, we did experiments of floral biology, reproductive biology, pollination efficiency and evaluate the effect of *Apis mellifera* hives on fruit set. The study was conducted with wild populations of *V. meridionale* in the Eastern Andes of Colombia. *Vaccinium meridionale* have a mixed reproductive system, produces fruits per agamospermy, selfing and outcrossing. However, the species promote outcrossing, since it has floral traits to attract a large group of pollinators (poricidal anthers with easy pollen release, female-biased nectar production, large floral display, long floral longevity) and show a strong inbreeding depression. *Apis mellifera* and the different castes (worker, male and queen) of *Bombus hortulanus* are efficient pollinators of *V. meridionale* and the presence of beehives not increase fruit-set but enhance fruit set by outcrossing. Cross-pollination by bees are essential for breeding of *V. meridionale* in terms of both conservation and production because may contribute to the maintenance of genetic variability of populations and good fruit production, which may decrease with high selfing rates.

Keywords: Beekeeping, *Apis mellifera*, *Bombus hortulanus*, Colombian oak forests, promising crops, inbreeding depression, pollination efficiency.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas	XI
Introducción.....	1
1. Importancia de los polinizadores en la reproducción de <i>Vaccinium meridionale</i> (Ericaceae), un frutal promisorio en Colombia.....	4
1.1 Introducción	4
1.2 Materiales y métodos	6
1.3 Resultados	12
1.4 Discusión.....	15
1.5 Conclusiones	23
2. Eficiencia de polinización y efecto de la presencia de colmenas de <i>Apis mellifera</i> sobre la producción de frutos de agraz <i>Vaccinium meridionale</i>	33
2.1 Introducción	33
2.2 Materiales y métodos	36
2.3 Resultados	39
2.4 Discusión.....	41
2.5 Conclusiones	45
3. Conclusiones y recomendaciones	55
3.1 Conclusiones	55
3.2 Recomendaciones	56
A. Anexo: Metodología	59
Bibliografía.....	61

Lista de figuras

- Figura 1-1. Inflorescencia (A), morfología (B), estados de apertura (C. Botón floral, D. Recto, E. Inclinado, F-H. Curvada) y senescencia (I-J) de la flor de *Vaccinium meridionale*. Desarrollo del fruto después de polinización a los 8 días (K) y tres semanas (L).29
- Figura 1-2. Características funcionales (A. Receptividad de estigma y Viabilidad de polen) y morfológicas (B. longitud del estilo y Distancia antera-estigma) de la flor de *Vaccinium meridionale* en diferentes estados de apertura de la flor. Se indican el promedio \pm error estándar. 30
- Figura 1-3. Cambios en el volumen (A) concentración (B) y cantidad de azúcar (C) del néctar de *Vaccinium meridionale* en diferentes estados de apertura de la flor, evaluados por medidas repetidas (varias medidas del mismo grupo de flores) y acumulativo (cada medida en diferentes grupos de flores y en diferentes momentos). Se presenta promedio (\pm error estándar).31
- Figura 1-4. Efecto de la primera remoción en el día sobre el volumen (μ L), concentración (% brix) y cantidad de azúcar (mg) en el néctar de *Vaccinium meridionale*. Valores marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Kruskal Wallis seguido por comparaciones múltiples de rangos medios, $p < 0,05$). Se presenta promedio (\pm error estándar).32
- Figura 2-1. Figura 1. Polinizadores de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). A. *Apis mellifera*, B. *Bombus atratus* (Reina), C. *Bombus hortulanus* (macho), D. *Bombus hortulanus* (obrero), E. Halictidae, F. Diptera. Fotografías. Fermín J. Chamorro.53
- Figura 2-2. Densidad de abejas melíferas, polinizadores nativos y de flores en diferentes momentos de la floración de *Vaccinium meridionale* en sitios con y sin colmenas. Se presenta promedio \pm error estándar.54

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Resumen de las características morfológicas y funcionales de flor de <i>Vaccinium meridionale</i> en sus dos fases florales.	25
Tabla 1-2. Retención inicial y final y proporción de frutos para los tratamientos de biología reproductiva evaluados en dos poblaciones de <i>Vaccinium meridionale</i>	26
Tabla 1-3. Características de frutos y semillas obtenidos con los diferentes tratamientos de biología reproductiva evaluados en <i>Vaccinium meridionale</i>	27
Tabla 1-4. Resultados del análisis de varianza para evaluar diferencias en la producción y aborto de frutos provenientes de polinización abierta con y sin suplementación de polen en dos poblaciones de <i>Vaccinium meridionale</i>	28
Tabla 2-1. Sitios seleccionados (con y sin colmenas) para evaluar el efecto de presencia de colmenas de <i>Apis mellifera</i> sobre la producción de agraz <i>Vaccinium meridionale</i>	47
Tabla 2-2. Deposición de polen por <i>Apis mellifera</i> y <i>Bombus hortulanus</i> en una sola visita a <i>Vaccinium meridionale</i> . N=número de flores. Se presenta promedio \pm error estándar.	48
Tabla 2-3. Formación (Inicial, Final) y aborto de frutos después de una sola visita de <i>Apis mellifera</i> y <i>Bombus hortulanus</i> a flores de <i>Vaccinium meridionale</i> . Se muestra promedio \pm error estándar.	49
Tabla 2-4. Características de los frutos de <i>Vaccinium meridionale</i> después de una sola visita de <i>Apis mellifera</i> y <i>Bombus hortulanus</i> . Se muestra promedio \pm error estándar.	50
Tabla 2-5. Visitantes florales de <i>Vaccinium meridionale</i> con su abundancia (número total de insectos observados) en sitios con y sin colmenas. Con X se indican visitantes florales observados en las flores pero que no se registraron durante los conteos.	51
Tabla 2-6. Densidad de <i>Apis mellifera</i> y de polinizadores nativos, deposición de polen y formación de frutos de <i>Vaccinium meridionale</i> en sitios con y sin colmenas. Se presenta promedio \pm error estándar. H=Prueba de Kruskal-Wallis.	52

Introducción

A nivel mundial, el 75% de los cultivos de alimentos dependen, al menos en parte, de la polinización por insectos (Klein *et al.* 2007). Aunque muchos alimentos básicos como el trigo, el maíz y el arroz, son polinizados por el viento, una gran proporción de otros alimentos como frutas, nueces y vegetales, que son fuente de micronutrientes (vitaminas y minerales) y que contribuyen a una dieta sana y equilibrada más allá de la ingesta de calorías, son dependientes de polinizadores (Eilers *et al.* 2011). Más de 2 billones de personas en el mundo sufren de “Hambre Oculta”, una condición causada por una mala nutrición y carencia de micronutrientes en la dieta y que es responsable de más de un 7% de las enfermedades. Esto subraya entonces la importancia de los polinizadores en la seguridad alimentaria de la población humana (Eilers *et al.* 2011).

Dentro de los polinizadores, las abejas constituyen uno de los grupos más importantes (Klein *et al.* 2007). Aproximadamente el 73% de los cultivos de frutas y semillas en el mundo son polinizados por alguna especie de abeja (Freitas y Pereira 2004) y en Colombia se estima que hay aproximadamente 1000 especies (Nates-Parra y González 2000). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la dependencia que tiene la producción agrícola nacional de los polinizadores, en particular de las abejas. Este conocimiento es la base para poder definir prioridades de investigación y de gestión, en especial cuando en el país se está haciendo conciencia sobre la importancia de la biodiversidad como parte fundamental de los procesos de desarrollo socioeconómico y del bienestar de los colombianos, reflejado en la nueva Política Nacional para la Gestión Integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos y en la formalización de la Iniciativa Colombiana de Polinizadores, Capítulo Abejas (ICPA). La ICPA tiene por objetivo promover el conocimiento, la divulgación, el manejo, uso sostenible y la conservación de los polinizadores-abejas en Colombia como elementos clave en la seguridad alimentaria y en el funcionamiento de los ecosistemas. Para determinar el grado de importancia de la polinización por abejas, es necesario realizar investigaciones que identifiquen el aporte específico de estos insectos en los diferentes cultivos y ecosistemas.

Un buen modelo para evaluar la importancia de las abejas como polinizadores son los cultivos frutales promisorios, que son aquellos que se encuentran en estado silvestre o no están extensivamente cultivados, son sub-utilizados, pero tienen gran potencial ecológico, para la conservación del medioambiente y son susceptibles de un aprovechamiento ambientalmente sostenible (Minambiente-SENA 2007). El conocimiento de la importancia de los polinizadores en la producción de los cultivos promisorios es fundamental para su manejo, independientemente de las características de su aprovechamiento (cultivada o recolección silvestre). Las áreas donde se dan las producciones de estos frutales aún sostienen poblaciones silvestres de polinizadores. Estas áreas requieren manejo y conservación para asegurar la permanencia espacial y temporal de las abejas, y de esta forma el servicio que prestan. El reconocimiento de impactos positivos como la polinización, sensibilizaría a las comunidades hacia la implementación de prácticas de conservación de las áreas naturales, en beneficio de la biodiversidad, la producción agrícola y los procesos ecosistémicos (Morandin & Winston 2006).

Entre los cultivos promisorios de creciente interés en Colombia se encuentra el agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw., Ericaceae). Sus frutos son una fuente importante de azúcares, vitaminas, minerales pero su principal atributo es el alto contenido de compuestos polifenólicos (flavonoides, antocianinas) que tienen actividad antioxidante (Garzón *et al.* 2010). El agraz es un arbusto que crece de forma silvestre en zonas altas de los andes Colombianos y las comunidades rurales recolectan los frutos para su posterior comercialización en plazas de mercado locales o venta a intermediarios. Los frutos del agraz se usan para elaborar una gran variedad de productos como postres, vinos y mermeladas (Torres *et al.* 2009). Para otras especies del género *Vaccinium* se conoce que la producción de frutos depende de la polinización por abejas y en las que son autofértiles, la producción, el tamaño de los frutos y el número de semillas aumentan en presencia de polinizadores (MacKenzie 2009). No obstante con respecto a *V. meridionale* no hay información suficiente sobre su sistema reproductivo y dependencia de polinizadores. Se ha registrado que sus flores pueden ser autofértiles (Tanner 1982) y en algunas zonas de la Cordillera Oriental sus principales visitantes florales y potenciales polinizadores son *Apis mellifera* y *Bombus hortulanus* (Hymenoptera: Apidae) (Pinilla 2013). El conocimiento de la importancia de los polinizadores en la reproducción del agraz no solo es importante en términos productivos sino también para el manejo y conservación de la especie, dado que se requiere mantener una variabilidad genética de la metapoblación y reducir la probabilidad de erosión genética por endogamia. El agraz es una planta clonal con poblaciones compuestas de plantas provenientes de reproducción sexual y asexual y en

la zonas donde se encuentra ha habido fragmentación de los bosques y un proceso extractivo no sostenible derivado del incremento en la demanda de los frutos (Medina *et al.* 2009).

Finalmente, en la Cordillera Oriental de Colombia, el agraz crece asociado a bosques de roble (Ligarreto *et al.* 2011), ecosistema amenazado en Colombia y para el cual la apicultura representa una alternativa de conservación (Chamorro *et al.* 2013a, b). Se han identificado productos apícolas (miel y polen) con origen botánico en el roble *Quercus humboldtii* (Fagaceae) y en otras especies nativas presentes en los bosques que pueden ser promovidos como productos forestales no maderables. Por lo tanto, evaluar la influencia de la polinización por *A. mellifera* sobre la producción de frutos de *V. meridionale*, aportaría a la valoración de la apicultura como alternativa productiva que puede ser integrada al manejo y conservación de biodiversidad en paisajes andinos con bosques de roble, a través del análisis de la importancia de la abeja melífera como polinizador del medio natural.

En el contexto anterior se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la influencia de la polinización por abejas sobre la producción y características de frutos y semillas de *Vaccinium meridionale* en algunas zonas de la Cordillera Oriental de Colombia.

Objetivos específicos

1. Determinar el sistema reproductivo y los requerimientos de polinización de *V. meridionale*.
2. Evaluar la eficiencia de polinización de los dos principales visitantes florales de *V. meridionale*: *A. mellifera* y *B. hortulanus*.
3. Evaluar el efecto de la densidad de abejas melíferas sobre la producción de frutos de *V. meridionale*.

1. Importancia de los polinizadores en la reproducción de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae), un frutal promisorio en Colombia

1.1 Introducción

El género *Vaccinium* es mejor conocido por las especies denominadas arándanos, las cuales son de gran importancia comercial, principalmente en Norteamérica y Europa, con producciones de frutos provenientes de especies cultivadas (*V. corymbosum*, *V. ashei* y *V. macrocarpon*) y silvestres (*V. myrtillosum* y *V. angustifolium*) (MacKenzie 2009; Nestby *et al.* 2011). Sin embargo, el género tiene una distribución más amplia y es uno de los pocos dentro de la familia Ericaceae con especies tanto en zonas templadas como tropicales, incluyendo el neotrópico (40 especies) (Pedraza & Luteyn 2011). Uno de los parientes silvestres del género *Vaccinium* en el neotrópico es *V. meridionale*, el cual se distribuye en Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Jamaica, pero en Colombia es donde se aprovecha de forma intensiva y ha sido reconocido como un cultivo promisorio (Ligarreto 2009). Se conoce como agraz o mortiño y crece de forma silvestre en bosques y matorrales de zonas altas de las cordilleras (2357-3168 msnm) (Ligarreto *et al.* 2011). Las comunidades rurales recolectan sus frutos para su posterior comercialización en plazas de mercado locales o venta a intermediarios (Torres *et al.* 2009). Los frutos del agraz se usan para elaborar una gran variedad de productos como postres, vinos y mermeladas y se ha determinado que presentan muy buenas propiedades nutraceuticas, principalmente antioxidantes (Garzón *et al.* 2010). Además los frutos de *V. meridionale* tienen un alto potencial de exportación, ya que esta especie ha sido incluida en la lista de especies que pueden ingresar al mercado de los Estados Unidos de América (Torres *et al.* 2009).

Para las especies de *Vaccinium* cultivadas y silvestres del hemisferio norte se ha determinado que los polinizadores, particularmente las abejas, son importantes en su reproducción. Algunas especies son xenógamas obligadas, sin polinización cruzada por abejas la producción de frutos es baja o no hay formación de frutos (*V. ashei*, *V. angustifolium*) (Brevis 2005, Usui 2005) y otras son auto-compatibles y partenocárpicas (*V. corymbosum*), aunque la polinización cruzada aumenta la

formación de frutos y el tamaño de éstos y disminuye el tiempo de maduración (Lang & Danka 1991, MacKenzie 1997, 2009). No obstante, para *V. meridionale* no hay información suficiente sobre la importancia de los polinizadores en su reproducción. Se conoce que *V. meridionale* puede ser auto-fértil (Tanner 1982), y es visitado por diferentes grupos de insectos (abejas, moscas, mariposas, avispas), aunque sus principales visitantes florales y potenciales polinizadores son *Apis mellifera* y los abejorros del género *Bombus* (*B. hortulanus*, *B. atratus*, *B. rubicundus*) (Pinilla 2013). Sin embargo se considera que el crecimiento vegetativo es su principal estrategia de propagación en hábitats naturales (Tanner 1982, Ligarreto *et al.* 2011). Además *V. meridionale* es una especie colonizadora de áreas disturbadas (Dalling 1994) y según Luteyn (2002), especies de ericáceas que son abundantes y comunes en zonas abiertas en sucesión y que producen altas densidades de flores y de frutos, como sucede con *V. meridionale*, son posiblemente facultativamente auto-compatibles como parte de su estrategia de colonización.

Por otra parte, hay un interés creciente en establecer el agraz como cultivo, para lo cual se ha desarrollado diferentes estudios de propagación sexual y asexual (Magnitskiy & Ligarreto 2007, Castrillón *et al.* 2008, Hernández *et al.* 2009, Rache & Pacheco 2010, Castro *et al.* 2012, Ligarreto *et al.* 2013). Dentro del potencial de propagación sexual se ha identificado que el tamaño del fruto es útil para este fin (Ligarreto *et al.* 2011), dado que semillas largas (más de 1,9 mm de longitud y 1,4 mm ancho) tienen altas tasas de germinación y pueden ser obtenidas de frutos grandes (Valencia & Ramírez 1993). Para el agraz no se conoce el efecto del tipo de polinización (autopolinización, polinización cruzada) sobre las características morfológicas de los frutos y semillas, pero para especies de *Vaccinium* cultivadas (*V. ashei*, *V. corymbosum*) se ha observado que al incrementar la polinización entre variedades, se produce un aumento en el tamaño de las semillas y de la producción de semillas apta para germinar dentro del fruto, lo que da origen a un fruto de mayor tamaño (Gupton & Spiers 1994, Mackenzie 1997).

El objetivo de este trabajo estuvo centrado en estudiar sistema reproductivo de *V. meridionale* y determinar si las adaptaciones florales de esta especie favorecen la xenogamia o por el contrario promueven la reproducción espontánea. Las preguntas de investigación que guiaron este trabajo fueron: ¿cuál es la importancia de los polinizadores en la reproducción de *V. meridionale* en los Andes orientales de Colombia? Si efectivamente *V. meridionale* es auto-fértil, ¿Cuáles son las características de los frutos y semillas de *V. meridionale* provenientes de autopolinización y de polinización cruzada?.

1.2 Materiales y métodos

Área de estudio. El estudio se realizó en dos localidades de la vertiente occidental de la cordillera Oriental de Colombia. La primera localidad se ubica en territorios de la Reserva Forestal Protectora El Robledal, al Norte del departamento de Cundinamarca, municipio de Guachetá, vereda Gachetá Alto (5° 27.545 N, 73° 39.657 W, 2.950 m). Es un área de conservación de bosques de roble *Quercus humboldtii*, donde *V. meridionale* crece de forma silvestre en zonas de potrero abandonadas, matorrales y en bosques de roble. La segunda localidad se ubica en el municipio de San Miguel de Sema, al occidente del departamento de Boyacá, en la vereda Quintoque Centro (5° 31.706 N 73° 42.887 W, 2.679 m). En esta localidad el agraz crece en medio de un bosque de pino, parcialmente talado para aumentar la cantidad de luz a las plantas, rodeado de relictos de bosques de roble, aunque predominan en general los pastos (limpios, enmalezados y arbolados, principalmente con aliso *Alnus acuminata*). Con respecto a las características climáticas, las dos zonas son similares, con un régimen de lluvias bimodal (abril-mayo y septiembre-octubre). La precipitación media anual se encuentra entre 900 y 1300 mm y la temperatura media anual entre 13 y 16 °C (Muñoz *et al.* 2009).

Para determinar la importancia de los polinizadores en la reproducción de *V. meridionale* se realizaron experimentos de biología floral y reproductiva. Los experimentos de biología floral se realizaron en Guachetá, en 2012 y 2013, durante la primera floración del año (enero-abril). Los aspectos de biología reproductiva se evaluaron en las dos localidades de estudio, de enero a junio de 2013 en Guachetá y de junio a noviembre de 2013 en San Miguel. No se realizaron en la misma época en las dos localidades debido a que la floración de inicio de año en San Miguel fue muy baja, había menos de 10 plantas florecidas y éstas tenían pocos racimos en floración por planta (menos de 50 racimos por planta). Con respecto a la biología floral se realizaron observaciones y experimentos sobre morfología y fenología floral, receptividad del estigma, viabilidad de polen y producción de néctar. Para caracterizar el sistema reproductivo se estimó la relación polen óvulo y se realizaron experimentos de polinización.

Morfología y fenología floral. Con el fin de caracterizar la morfología floral e identificar rasgos florales informativos para describir la fenología de la flor, se realizaron observaciones y mediciones de botones y flores abiertas de 15 plantas. De cada planta, se tomaron tres ramas y de cada rama un botón y 4 flores abiertas. Se midieron y describieron las siguientes características: longitud total de la flor, apertura de la corola, diámetro de la corola, número de lóbulos de la corola, posición de los lóbulos de la corola (recta, inclinada, curvada), color de la corola, longitud del estilo, distancia

antera-estigma, superficie estigmática y color de las anteras. Con base en lo anterior se definieron estados de apertura de la flor y se procedió a determinar el tiempo requerido por un botón para alcanzar cada una de estos estados y caracterizarlos con base en atributos morfológicos, funcionales (viabilidad de polen y receptividad de estigmas) y de producción de néctar. De las características morfológicas evaluadas inicialmente se seleccionaron: distancia antera-estigma y longitud del estilo, para describir los diferentes estados de apertura de la flor. Para esto se marcaron con hilos de colores 210 botones florales en 25 plantas (2012: 100 botones, 10 plantas; 2013: 110 botones flores, 15 plantas). A cada botón marcado con amarillo se le asignó un estado de apertura en el cual se removió de la planta para hacerle las medidas mencionadas anteriormente.

Viabilidad de polen. Se evaluó por medio de germinación de polen “in vitro” en sacarosa. Dado que en algunas especies el porcentaje de germinación de los granos de polen es óptimo a ciertas concentraciones de sacarosa (Dafni *et al.* 2005), se evaluó la germinación de polen de *V. meridionale* en soluciones de 0, 15, 30, 45 y 60 % de sacarosa. De cada concentración se realizaron ocho réplicas, que consistieron en sembrar en placas (múltiples pozos) para cultivo de células, una mezcla de polen de los diferentes estados de apertura de la flor. Estas siembras se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas, y transcurrido este tiempo se les agregó una gota de azul de metileno para realizar conteo de granos de polen germinados y no germinados en microscopio óptico (10x). Se contó un mínimo de 100 tétradas y se consideraron germinados las tétradas con crecimiento de tubo polínico de al menos un grano de polen y que este fuera más largo que el diámetro de la tétrada (Anexo A-1). De este experimento se seleccionó la solución de sacarosa al 15%, debido a que fue la única concentración en la que se registró crecimiento de tubos polínicos. Para evaluar la viabilidad de polen por estados de apertura de la flor se marcó y realizó el seguimiento de 161 botones en 25 plantas (2012:51 botones, 10 plantas; 2013: 110 botones, 15 plantas). En cada planta se marcaron entre 4 y 7 botones, cada uno de estos asignados a un estado de apertura floral. Cuando la flor alcanzaba el estado de apertura asignado, se retiraba de la planta y se sacaba el polen agitando las anteras con ayuda de pinzas. La siembra y conteo del polen se realizó de la misma forma descrita anteriormente. A partir de los conteos se estimó el porcentaje de polen viable por estado de apertura floral.

Receptividad de estigma. Se evaluó por el método de polinización cruzada manual. Para esto se marcó y se siguió el desarrollo de 135 botones florales en 25 plantas (2012: 42 botones, 10 plantas; 2013: 93 botones, 15 plantas). Cada botón fue asignado a un estado de apertura de la flor y se emascularon para evitar la deposición de polen de la misma flor. Cuando la flor alcanzó el estado de

apertura asignado, se polinizó manualmente con una mezcla de polen de 3 a 4 plantas parentales externas al grupo experimental. Las flores estuvieron embolsadas con malla de tul antes y después de efectuada la polinización manual; pasadas 24 horas se retiraron los estilos de las flores y se fijaron en FAA (Formol: Alcohol: Ácido acético) con el fin de prepararlos según Martin (1959) y realizar conteos de tubos polínicos en el ápice del estilo de microscopio de epi-fluorescencia (Anexo A-2).

Néctar. Se midió volumen (uL), concentración (% brix) y cantidad de azúcar (mg) en diferentes estados de apertura de la flor. El volumen del néctar se midió con capilares calibrados de 10 μ l y la concentración de azúcares (% Brix), con un refractómetro de bolsillo (rango: 0-90%). Para estimar la cantidad de azúcar por flor, primero se calculó la cantidad de azúcar por microlitro de néctar (y) según Galetto & Bernardello (2005): $y=0,00226 + (0,00937 x) + (0,0000585 x^2)$, donde x es la concentración (% brix). Este valor se multiplicó por el volumen total medido en la flor. La producción de néctar se evaluó por dos métodos: acumulativo (60 flores) y medidas repetidas (80 flores). El método acumulativo consiste en medir el néctar una sola vez, cuando la flor llega a la fase floral asignada y el método de medidas repetidas consiste en medir una misma flor en diferentes momentos de su ciclo floral. La comparación de estos métodos permite evaluar el efecto de la remoción sobre la secreción de néctar. También se evaluó la producción de néctar en diferentes momentos del día para determinar si hay reabsorción o se acumula. Para esto se extrajo el néctar una sola vez a tres grupos de flores asignado a tres momentos del día (mañana: 7 am, mediodía: 12m, tarde: 5pm) sobre la producción de néctar. Se utilizaron 60 flores en 10 plantas (6 por planta, 2 por grupo). Con esta segunda prueba se evaluó la producción de néctar a lo largo del día.

Relación polen/óvulo. Con el fin de complementar la descripción del sistema reproductivo de *V. meridionale* se estimó la producción de polen y el número de óvulos por flor en 30 botones florales. Una antera de cada botón se colocó en un tubo de micro centrifuga con 0,5 ml de KOH (1 N) a baño maría por 10 minutos y con ayuda de una aguja se macero la antera para asegurarse de que saliera el polen. El contenido total del tubo se colocó en varias láminas portaobjetos para realizar el conteo de la cantidad de polen por antera. Para facilitar el conteo, se colocó debajo de la lámina otra lámina con una grilla y se contaba el polen por cuadrantes. Al mismo botón de donde se extraía la antera también se le contaba el número de anteras y el número de óvulos. Para el conteo de los óvulos, el ovario se colocó en un tubo de micro centrifuga con 1,5 ml de KOH (1 N) a baño maría por 10 minutos y después se hizo un “squash” en una lámina portaobjetos. Los conteos de óvulos se

realizaron en microscopio óptico a 4x. La estimación de la cantidad de polen por flor se obtuvo al multiplicar la cantidad de tétradas por cuatro y por el número de anteras por flor. Con los valores obtenidos se obtuvo la relación polen/ovulo según Cruden (1977).

Experimentos de polinización. Para determinar el sistema reproductivo y dependencia de polinizadores de *V. meridionale* se marcaron ramas y en cada rama se marcaron con hilos 30 botones florales (Anexo A-3 a 5). Cada rama marcada en una planta se tomó como una sola unidad floral (réplica) y se asignó a uno de los siguientes tratamientos:

Apomixis: para evaluar la formación de frutos sin semillas (partenocarpia) y/o formación de frutos y semillas (agamospermia) de forma asexual. Para esto se emascularon (remoción de anteras) los botones florales y se aisló la rama con una bolsa de tul (Anexo A-6). Debido a que la remoción de las anteras resultó difícil por el tamaño de flor y para comprobar la formación de semillas sin participación de polen, por contaminación de la manipulación de la flor o por el viento, en la localidad de San Miguel se evaluó un segundo tratamiento de apomixis con la remoción de estigmas. Así que se evaluó apomixis con estigmas (Guachetá y San Miguel) y apomixis sin estigmas (San Miguel).

Autopolinización espontánea: Se aisló la rama con una bolsa de tul sin recibir ningún otro tipo de manipulación. De este modo sólo el polen de la misma flor (o el potencialmente transportado por el viento) pudo polinizar las flores.

Geitonogamia: para evaluar la existencia de auto-compatibilidad, es decir si el polen de la misma planta es capaz de germinar en el estigma, crecer en el estilo y fecundar los óvulos. Se emascularon los botones florales, se aisló la rama con una bolsa de tul y una vez la flor llegó a su momento de mayor receptividad de estigma se polinizó manualmente con polen viable producido por flores de la misma planta. La polinización se realizó con ayuda de un palillo de dientes y luego de la polinización, la rama se embolsó nuevamente.

Xenogamia: para evaluar la compatibilidad de polen de otras plantas. Los botones florales se emascularon, la rama se aisló con una bolsa de tul y una vez la flor llegó a su momento de mayor receptividad estigmática se polinizó manualmente con polen viable de otras plantas (4-5) diferentes del grupo experimental. La polinización se realizó con palillo de dientes y después de la polinización, las flores se embolsaron nuevamente.

Polinización abierta: la rama se dejó expuesto a los polinizadores para evaluar niveles de polinización natural.

Suplementación: Con el fin de determinar si las poblaciones estudiadas se encuentran bajo limitación de polen, flores expuestas a polinizadores se suplementaron con polen de otras plantas (4-5 plantas a más de 50 m de distancia) diferentes del grupo experimental.

Tres semanas después de aplicados los tratamientos se revisaron las ramas para registrar si ocurrió o no formación de frutos (retención inicial) y quince semanas después de la primera revisión se contaron los frutos cercanos a la madurez (retención final). Estos se retiraron de las ramas para medirlos con un calibrador (alto y ancho), pesarlos, contar el número de semillas y medir las semillas (alto y ancho). Para extraer las semillas, los frutos se maceraron suavemente y con ayuda de pinzas se separaron las semillas y se eliminaron los restos del pericarpio. Las semillas se midieron en microscopio óptico a 4x (con el posterior ajuste de tamaño).

Análisis de datos. Se calcularon estadísticas descriptivas (promedio \pm desviación estándar) para características morfológicas de los estambres y relación polen/óvulo. También para las variables evaluadas a lo largo de la vida de flor: morfológicas (longitud del estilo, distancia antera-estigma), funcionales (receptividad de estigma: número de tubos polínicos en el ápice del estilo; viabilidad de polen: porcentaje de germinación del polen) y de producción de néctar (volumen, concentración, cantidad de azúcar). El efecto de la edad de la flor sobre las características morfológicas se evaluó con análisis de multivariado de la varianza (MANOVA) y sobre las características funcionales con análisis de varianza de un factor (edad). Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson para analizar la relación entre receptividad de estigma, distancia antera-estigma y longitud del estilo. Se analizó el efecto de la edad de la flor sobre la producción de néctar con análisis de varianza por rangos (Kruskal-Wallis, métodos acumulativo; Friedman, medidas repetidas), ya que los datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza (prueba de Levene, $p < 0,05$). Con base en los análisis anteriores se definieron dos fases florales, las cuales se compararon con prueba t (variables morfológicas y funcionales) y Mann-Whitney (variables de néctar). Se evaluó el efecto de la primera remoción en el día (AM, M, PM) sobre la producción de néctar con Kruskal-Wallis.

La retención inicial y final de frutos se expresó en términos de proporción: número de frutos formados en la rama/número de flores tratadas en la rama. Con base en la proporción inicial y final de frutos se calculó la proporción de frutos abortados (retención inicial-retención final/retención inicial). Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la retención inicial, retención final y proporción de frutos abortados, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, dado que los datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza (prueba de Levene, $p < 0,05$). Cuando la prueba resultó

significativa se realizaron comparaciones múltiples de rangos medios (Siegel & Castellan, 1988) para identificar diferencias entre pares de tratamientos. Los datos de peso, alto y ancho de frutos, número, alto y ancho de semillas se agruparon por replica de cada tratamiento. Estas variables cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y se evaluó el efecto del tratamiento con MANOVA. Se realizó por separado para cada localidad ya que para San Miguel se aplicó un tratamiento adicional (apomixis sin estigmas) y no se incluyó el tratamiento de polinización abierta, dado que solamente se formaron frutos en una sola replica.

Se analizaron diferencias en retención inicial, retención final y proporción de frutos abortados entre la polinización abierta con y sin suplementación con análisis de varianza de dos factores (localidad y tratamiento). Las variables cumplieron con los supuestos de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene, $p > 0,05$), normalidad e independencia (análisis de residuos). Todos los análisis estadísticos se realizaron en STATISTICA 10 (StatSoft, 2011).

Con base en los resultados de retención final de frutos se estimaron los siguientes índices:

Índice de autofertilidad (Lloyd & Schoen 1992): (Aut/Xen) . Mide la capacidad de las flores para autopolinizarse en ausencia de polinizadores.

Índice de auto-compatibilidad (Lloyd & Schoen 1992): (Gei/Xen) . Mide la capacidad de una planta para producir cigotos después de ser polinizada con polen de la misma flor o planta con relación a polinización cruzada. Un valor de uno indica auto-compatibilidad; valores menores de 0.75 indican auto-compatibilidad parcial.

Tasa de autogamia (Charlesworth & Charlesworth 1987): $(Xen-Exp-/Xen-Gei)$. Mide la proporción de producción de frutos o semillas atribuibles a autopolinización.

Depresión por endogamia (Charlesworth & Charlesworth 1987): $1-(Gei/Xen)$. Mide la reducción en la progenie endogámica en relación con aquella proveniente de polinización cruzada.

Índice de limitación de polen (Larson & Barrett 2000): $1- (Exp/Sup)$. Mide el grado en el cual el éxito reproductivo de una población está limitado por insuficiente deposición de polen. Un valor de cero indica que no existe limitación por polinización en la población estudiada.

En los índices, Aut=retención de frutos por autopolinización espontánea, Xen= retención de frutos por polinización cruzada manual, Gei=retención de frutos por geitonogamia, Exp=retención de

frutos por polinización abierta y, Sup=retención de frutos de flores expuestas a polinizadores con suplementación de polen.

1.3 Resultados

Biología floral. Las flores de *V. meridionale* se encuentran agrupadas en inflorescencias racimosas (Fig. 1A), son completas y perfectas. Presentan un pedicelo glabro, un cáliz gamosépalo, con lóbulos verdes e hipanto cilíndrico. La corola es gamopétala, tubular con cuatro o cinco lóbulos, a veces en la misma planta, de color blanco rosado claro a intenso. El gineceo se compone de un estilo glabro y ovario ínfero (Fig. 1B) y el androceo de 9 ± 1 estambres, los cuales a su vez presentan un filamento piloso blanco de $2,37 \pm 0,30$ mm de largo y anteras de $3,68 \pm 0,37$ mm de largo, con papilas de $0,41 \pm 0,16$ mm de largo y dos túbulos de $2,27 \pm 0,26$ mm de largo que terminan en poros oblicuos. El polen se presenta en forma de tétradas y sale fácilmente al agitar las anteras. No obstante en algunas plantas las flores presentan estambres completos pero las anteras no producen polen, es decir, planta morfológicamente hermafroditas pero funcionalmente femeninas. Basado en las plantas utilizadas en las diferentes observaciones y experimentos se estimó una frecuencia de plantas femeninas de $17 \pm 3\%$.

Vaccinium meridionale produjo flores durante todo el año, aunque se observaron dos épocas de máxima floración. La primera de febrero a abril y la segunda de julio a septiembre, pero los individuos en floración en cada época son diferentes. Un arbusto produce en promedio 385 ± 116 racimos y 12 ± 3 flores por racimo a lo largo de su floración, con un máximo de floración (1128 ± 1020 flores por planta) al inicio del periodo de floral que disminuye a medida que avanza la floración. Se identificaron cuatro estados de apertura floral con base en la curvatura de los lóbulos de la corola: botón (B), recta (R, corola abierta con los lóbulos rectos), inclinada (I, corola abierta con los lóbulos levemente inclinados), curvada (C, corola abierta con los lóbulos completamente curvados). (Fig. 1). A partir de este último estado se nombraron según el número de días que duraba en la planta (Curvada 1-6 día). Los lóbulos de la corola pasan a un estado recto en $1 \pm 0,5$ días, inclinándose $0,5 \pm 0,5$ días después y curvándose completamente a los 2 ± 1 días después de registrada su apertura.

Las flores tienen una longevidad promedio de 8 ± 2 días y son protándricas. Desde el estado de botón se registró viabilidad de polen, la cual se mantuvo relativamente constante durante los dos primeros días de apertura floral, con un descenso a partir del tercer día, por lo que el efecto de la edad fue significativo ($F_{9/152}=2,50$; $p=0,011$) (Fig. 2A). No obstante, la receptividad del estigma aumentó a

medida que avanzaban los días, aunque fue relativamente alta a partir del cuarto día ($F_{9/133}=3,53$; $p=0,001$), un día después de que comienza a disminuir la viabilidad de polen (Fig. 2A). Igualmente, se encontró que la receptividad del estigma se relaciona positivamente con el incremento en la longitud del estilo ($r=0,33$; $p < 0,01$) y en la distancia antera-estigma ($r=0,42$; $p < 0,01$) que se incrementan con la edad de la flor (Wilks=0,40; $F_{18/192}=6,107$; $p=0,000$). En el estado de botón, las anteras y el estigma se encuentran casi en un mismo plano ($DAE=0,21 \pm 0,34$) pero a partir del cuarto día pueden estar separadas hasta por más de un milímetro (hercogamia), debido a que se alarga el estilo (Fig. 2B).

El néctar se produce en la base del estilo y los filamentos de los estambres ayudan a su retención (Fig. 1B). La producción de néctar incrementa con la edad de la flor (Tabla 1), con un efecto significativo sobre el volumen (acumulativo: $H=21,96$ $gl=5$ $p=0,000$; medidas repetidas: ANOVA $\chi^2=12,75$ $gl=5$ $p=0,026$), la concentración de azúcares (acumulativo: $H=25,73$ $gl=5$ $p=0,000$; medidas repetidas: ANOVA $\chi^2=15,82$ $gl=5$ $p=0,007$) y la cantidad de azúcar (acumulativo: $H=31,85$ $gl=5$ $p=0,000$; medidas repetidas: ANOVA $\chi^2=32,80$ $gl=5$ $p=0,000$) producido por flor. En general, la producción de néctar fue más baja en las flores sometidas a medidas repetidas comparadas con aquellas que se dejaron que acumularan néctar durante un periodo de tiempo (Fig. 3). En particular la concentración y la cantidad de azúcar fueron más bajas con medidas repetidas (Fig. 3). Hay mayor disponibilidad de néctar en las horas de la mañana, con reabsorción activa durante el día. El volumen y la cantidad de azúcar son significativamente más altos en la mañana (Volumen: $H=72,84$ $gl=2$ $p=0,000$; Azúcar: $H=40,11$ $gl=2$ $p=0,000$), pero la concentración se mantiene constante ($H=0,65$ $gl=2$ $p=0,721$) (Fig. 4).

De acuerdo con lo anterior, la antesis se puede dividir en dos fases: flor masculina y flor homógama con hercogamia (Tabla 1). La fase masculina comprende los primeros tres días de antesis, tiempo durante el cual los lóbulos de la corola se curvan completamente, la viabilidad de polen es más alta y aunque hay oferta de néctar la principal recompensa floral es el polen. La fase homógama con hercogamia se inicia al cuarto día de apertura floral, cuando la distancia antera-estigma se encuentra por encima de los 0.7 mm, lo que coincide con un incremento en la receptividad del estigma y con una mayor oferta de néctar. La producción de néctar (volumen, concentración y mg de azúcar) es significativamente más alta durante la fase homógama (Tabla 1). Desde el sexto día de apertura floral se registró senescencia, con pérdida de turgencia, manchas de color café y desprendimiento de la corola junto con los estambres (Fig. 1I-K).

Sistema reproductivo y dependencia de polinizadores. La formación de frutos (medida como la relación frutos/flor) también difirió entre tratamientos de polinización. Se produjeron frutos por apomixis (con y sin estigmas), en ausencia de polinizadores y polinización cruzada (xenogamia y geitonogamia). No obstante, la producción de frutos fue relativamente baja con todos los tratamientos y en las dos localidades estudiadas (Tabla 2).

La retención inicial (3 semanas después de aplicados los tratamientos) difirió entre tratamientos de polinización en las dos localidades (Guachetá: $H=12,05$ $gl=4$ $p=0,017$; San Miguel: $H=39,06$ $gl=5$ $p=0,000$) (Tabla 2). Los tratamientos de apomixis con estigmas y autopolinización espontánea registraron la proporción más alta de formación de frutos (Guachetá y San Miguel, respectivamente). En Guachetá, para polinización abierta la retención inicial fue similar a las registradas con autopolinización espontánea y xenogamia, pero en San Miguel, ésta registró los valores más bajos junto el tratamiento de geitonogamia. En las dos localidades con el tratamiento de geitonogamia la formación de frutos fue significativamente baja.

La proporción de flores que con el tiempo dio lugar a frutos maduros (retención final) fue diferente en las dos localidades. En la localidad de Guachetá no se encontraron diferencias entre los tratamientos de polinización ($H=4,46$ $gl=4$ $p=0,347$), no obstante la retención final en San Miguel fue significativamente más alta con los tratamientos de apomixis con estigmas y autopolinización espontánea ($H=24,62$ $gl=5$ $p=0,000$). Con los tratamientos geitonogamia y polinización abierta se obtuvieron los valores más bajos de retención final de frutos. Los tratamientos de apomixis sin estigmas y xenogamia no difirieron entre ellos en la formación de frutos pero ésta fue más alta con relación a geitonogamia y polinización abierta y cercana a la registrada con apomixis con estigmas y autopolinización espontánea (Tabla 4).

La proporción de frutos abortados fue más alta en San Miguel que en Guachetá (Tabla 4). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Guachetá: $H=7,58$ $gl=4$ $p=0,108$; San Miguel: $H=7,16$ $gl=5$ $p=0,209$), con el tratamiento de xenogamia se registró la proporción más baja de aborto de frutos. Con polinización abierta la proporción de aborto de frutos fue similar a la obtenida con apomixis (con y sin estigmas), autopolinización espontánea y geitonogamia.

Con respecto a las características de frutos y semillas no se encontraron diferencias entre tratamientos ni en Guachetá (Wilks=0,69; $F_{24/172}=0,80$; $p=0,735$) ni en San Miguel (Wilks=0,54; $F_{24/102}$; $p=0,708$) (Tabla 5). No obstante, para Guachetá con el tratamiento de xenogamia se

registró en promedio los valores más altos para peso, alto y ancho de los frutos y alto y ancho de las semillas. En general, las características de frutos y semillas fueron similares para los tratamientos de polinización abierta y geitonogamia (Tabla 5).

Relación polen óvulo e índices relacionados con el sistema reproductivo. Se estimó un promedio de 26290 ± 5881 granos de polen y 47 ± 7 óvulos por flor, con una relación polen/ovulo de 571 ± 133 , lo que clasifica a la especie como xenógama facultativa. El valor del índice de auto-compatibilidad fue 0,50 para la población de Guachetá y 0,17 para la de San Miguel. El valor del índice de auto-fertilidad fue 0,71 para la población de Guachetá y 0,99 para la de San Miguel. La tasa de autogamia fue de 0,04 para la población de Guachetá y 0,74 para la localidad de San Miguel. La depresión por endogamia fue 0,50 para la población de Guachetá y 0,83 para San Miguel.

Limitación de polen. No se encontró un efecto significativo del tratamiento ni de la localidad ni de la interacción entre estos factores sobre la formación (inicial y final) y aborto de frutos (Tabla 6). El valor del índice de limitación de polen fue 0 para la localidad de Guachetá y de 0,3 para localidad de San Miguel.

1.4 Discusión

Biología floral. *Vaccinium meridionale* presenta flores urceoladas y péndulas, rasgos florales que obligan a los visitantes florales a colgarse de las flores y entrar en contacto con el estigma. También presentan anteras poricidas, lo que indica que se requiere de vibraciones de alta frecuencia o vibraciones específicas para liberar el polen (síndrome de polinización por zumbido o vibración, Buchmann 1983, De Luca y Vallejo-Marín 2013). De acuerdo con los rasgos florales mencionados las flores de *Vaccinium* se encuentran diseñadas para favorecer la polinización cruzada por insectos, en particular por aquellos capaces de hacer polinización por vibración. No obstante, las flores ofrecen néctar como recompensa a los polinizadores, el polen se presenta en forma de tétradas y su liberación de las anteras se da fácilmente sin vibración, características que contrastan con el síndrome de polinización por vibración. La liberación de polen sin vibración se ha registrado para *Rhexia virginica* (Melastomataceae), una especie con morfología típica del síndrome de polinización por zumbido (Larson y Barrett 1999). De esta forma, la polinización no estaría limitada a los insectos que hacen polinización por vibración, sino que se amplía el espectro de visitantes florales, que también pueden actuar como polinizadores (Cane *et al.* 1985).

Para el área de estudio se conoce que las flores de *V. meridionale* son visitadas por abejas (*Apis mellifera*, *Bombus hortulanus*, *B. rubicundus*, *B. atratus*, *Thygater*, Halictidae) moscas, mariposas, polillas y avispa (Pinilla 2013, Chamorro, obs. pers.). De estos, *Bombus* y *Thygater* realizan polinización por zumbido y se han observado en las flores de *V. meridionale* haciendo vibrar las anteras para recoger polen (Pinilla 2013). No obstante, *A. mellifera* que no tiene la capacidad de vibración y las moscas, que se observaron solamente recolectando néctar, también transportan polen de *V. meridionale* (Pinilla 2013). Aunque la cantidad de polen que transportan es baja (7 ± 20 tétradas) comparada con la transportada por *Bombus* (24 ± 45 tétradas) (Pinilla 2013), en el caso de *A. mellifera* se conoce que ésta es suficiente para polinizar y producir frutos (capítulo 2). Con lo anterior se refuerza la hipótesis de que los rasgos florales de *V. meridionale* tienden a promover la polinización por vibración, en particular por *Bombus*, pero asimismo no excluyen a otros posibles polinizadores.

Los estambres de *V. meridionale* presentan papilas (Fig. 1B) que facilitan que las abejas puedan presionar las anteras durante la vibración cuando van por polen, pero que junto con los tricomas en los filamentos de los estambres (Fig. 1B) actúan como mecanismo de barrera para que los insectos que van por néctar no lo tomen desde el espacio entre la corola y los estambres sino que tienen que introducir su lengua por entre las anteras y de esta forma reciben polen sin vibración (Stephens *et al.* 2012). No obstante, también se considera que las papilas pueden contribuir a la autopolinización por viento, ya que las corrientes de aire hacen golpear las papilas contra las paredes de la corola y liberan el polen de los túbulos de la antera (Hagerup 1954). La autogamia por viento puede ser uno de los mecanismos que expliquen la formación de frutos con el tratamiento de exclusión de polinizadores en *V. meridionale*. Aunque también puede haber polinización por viento, dado que crece en ambientes abiertos con fuertes corrientes de aire que podrían liberar el polen, como ha sido reportado para otras ericáceas como *Calluna vulgaris* (Mahy *et al.* 1998), *Pernettya rigida* (Anderson *et al.* 2000) y *Pernettya mucronata* (Arroyo & Squeo 1987).

Las flores de *V. meridionale* presentan protandria y hercogamia, rasgos florales que tienen la función primaria de reducir la interferencia entre las funciones sexuales femenina y masculina e incrementar la cantidad de polen disperso hacia otros individuos y de esta forma prevenir la autopolinización y promover la polinización cruzada (Barrett 2002). No obstante, si la especie es hermafrodita auto-compatible con un gran despliegue floral, la protandria y la hercogamia no son efectivos para evitar la autogamia, debido a un incremento de deposición de polen de la misma planta facilitada por polinizadores (Medrano *et al.* 2005). *Vaccinium meridionale* es parcialmente

auto-compatible, con un gran despliegue floral, las abejas visitan entre 10 y 20 flores de forma secuencial en una misma rama, lo cual podría incrementar las tasas de auto-fertilización vía geitonogamia. Asimismo, dado que la liberación de polen se da fácilmente sin vibración y este permanece viable cuando el estigma se vuelve receptivo, hay deposición de polen de la misma flor facilitada por insectos, lo que también haría poco efectiva la separación espacial y temporal de estructuras reproductivas.

Las flores de *V. meridionale* duran entre 6 y 10 días, lo cual se considera una longevidad floral larga y característica de la familia ericaceae (Primack 1985). También es común en especies de montaña, tanto en los andes como en otras regiones del mundo (Primack 1985, Rathcke 2003, Steinacher & Wagner 2010, Torres-Díaz *et al.* 2011). Una larga longevidad floral junto con gran despliegue floral en especies de alta montaña, se consideran mecanismos compensatorios para aumentar la atracción de polinizadores y/o la probabilidad de polinización, con el fin de asegurar la fecundación cruzada, en situaciones o ambientes de escasez e imprevisibilidad de polinizadores (hipótesis de “aumento en la probabilidad de polinización”, Torres-Díaz *et al.* 2011). No obstante, largas longevidades florales y grandes despliegues florales, como los mostrados por *V. meridionale* pueden incrementar la geitonogamia (Rathcke 2003, Ashman 2004), que según el sistema reproductivo de la especie llevaría a altas tasas de depresión de endogamia (ver discusión más adelante) y a una reducción en el éxito reproductivo femenino (producción de frutos y semillas). Por lo tanto, la geitonogamia es una negativa pero inevitable consecuencia de mantener el entrecruzamiento en el proceso de exportar e importar polen e incrementar el éxito reproductivo masculino y femenino (Harder & Barret 1995, Mitchell *et al.* 2004).

Como se señaló anteriormente, las flores de *V. meridionale* producen néctar como recompensa para sus polinizadores. El néctar es la recompensa floral más importante ofrecida por las angiospermas a sus visitantes florales y sus características (volumen, concentración, dinámica de secreción, entre otras) influyen sobre el comportamiento de estos (frecuencia de visitas y movimiento entre las flores) y en consecuencia sobre la importación y exportación de polen (Galletto & Bernardello 2005). En *V. meridionale*, se encontró que el volumen, la concentración de azúcares y los miligramos de azúcar en el néctar son afectados por la edad de la flor, con un sesgo hacia la función femenina. Se registró una mayor producción de néctar cuando el estigma estuvo completamente receptivo. Este sesgo puede estar relacionado con procesos de selección sexual y/o puede ser un mecanismo para reducir la geitonogamia (Carlson & Harms 2006). En el caso de *V. meridionale* parece estar relacionado con ambos mecanismos, ya que la especie se encuentra bajo una posible

fenómeno de ginodioecia (ver discusión más adelante) y existe una alta probabilidad de geitonogamia dado el gran despliegue floral y la larga longevidad de las flores. Un sesgo femenino en la producción de néctar puede afectar el comportamiento de los polinizadores, ya que estos tenderían a moverse entre plantas para buscar flores completamente abiertas que tienen mayor recompensa. De esta forma podría aumentar el éxito reproductivo masculino (transferencia de polen) y femenino (fertilización de óvulos).

Las flores que estuvieron sometidas a medidas repetidas produjeron menor cantidad de néctar comparadas con las que se removió una sola vez. Además el néctar se produce una sola vez en el día (posiblemente en la noche), se encuentra disponible principalmente en la mañana, se reabsorbe durante el día e incrementa con la edad. Estas características pueden ser resultado de un “trade-off” entre el cumplimiento de las funciones masculina y femenina y el coste energético de producir el recurso día a día. La producción de néctar implica un costo para la planta en términos de crecimiento y / o la reproducción (Pyke 1991), en consecuencia, la disminución de la producción total de néctar después de la extracción y la reabsorción de néctar podrían reducir este costo (Bernardello *et al.* 2004). La reabsorción de néctar permitiría a la planta reutilizar los recursos e invertirlos al siguiente día si la polinización no ocurre (Nepi & Stpiczyńska 2008). Una disminución en la cantidad de néctar producido en las flores que fueron sometidas a medidas repetidas, sugiere que la secreción de néctar puede reducirse o detenerse después de las visitas de los polinizadores. Este mecanismo puede maximizar la transferencia de polen porque los polinizadores tendrían que visitar diferentes flores y tal vez diferentes plantas con el fin de satisfacer sus necesidades metabólicas (Heinrich 1975) lo que reduciría la posibilidad de geitonogamia. La mayor disponibilidad de néctar en la mañana y reabsorción activa durante el día, puede estar relacionado con los polinizadores naturales de la especie, los abejorros del género *Bombus*, los cuales visitan las flores desde muy temprano, incluso bajo condiciones de baja temperatura (Heinrich 1975). El incremento en la producción de néctar con la edad de la flor puede aumentar la posibilidad de geitonogamia pero también puede aumentar la probabilidad de polinización.

Sistema reproductivo. *Vaccinium meridionale* presentó un sistema reproductivo mixto, con producción de frutos y semillas por autogamia, alogamia y agamospermia. Igualmente según el índice de auto-compatibilidad (0,33) y la relación polen/óvulo (571 ± 133), la especie es parcialmente auto-compatible y xenógama facultativa, respectivamente. A excepción de la agamospermia, estos resultados están de acuerdo con lo registrado para otras especies de *Vaccinium* (Jacquemart & Thompson 1996, Stephens *et al.* 2012) y en general para las Ericaceae (Jacquemart

2003) que se consideran presenta sistemas reproductivos mixtos. Asimismo concuerdan con lo propuesto por Cruden (1977) y Ramírez (2005), quienes mencionan que los sistemas de cruzamientos están relacionados con el hábitat, porque en aquellos hábitats con condiciones ambientales poco estables, las especies benefician la mezcla de diferentes sistemas de cruzamiento, presentándose las xenógamas facultativas, que regularmente son autocompatibles, las cuales comúnmente requieren de un polinizador. Esto a su vez está de acuerdo con la hipótesis de Luteyn (1989), que propone que especies de Ericaceae de hábito leñoso y colonizadoras, como *V. meridionale*, son facultativamente auto-compatibles. Las perturbaciones han sido favorables para las ericáceas neotropicales y sugiere que han evolucionado y seguirán haciéndolo como oportunistas de hábitats perturbados. Por lo tanto, su función primaria es ser pioneras o colonizadoras en ambientes de montaña inestables donde los polinizadores también pueden ser escasos. Al relacionar esto con los mecanismos morfológicos de la flor para reducir la autogamia como la dicogamia, se presenta una concordancia con Ramírez (2005), que menciona que mecanismos de dicogamia y hercogamia, están influenciados de manera significativa por el hábitat y la protandria tiende a incrementarse en ambientes severos. Con respecto a la apomixis, esto puede corresponder a su estrategia de reproducción clonal (Mandujano 2007) y en un escenario de colonización la apomixis se considera una ventaja para el aseguramiento reproductivo (Richards 2003).

En las dos localidades estudiadas se registró una producción de frutos relativamente baja con relación a la cantidad de flores utilizada en los experimentos y registrada en las plantas (14% para Guachetá y 9% para San Miguel). Al respecto se han planteado múltiples hipótesis (Gutián 1993), las cuales no son mutuamente excluyentes: a) El exceso de producción de flores es una ventaja ya que aumenta el atractivo general de la planta para los polinizadores y mejora las tasas de fertilización generales (hipótesis de atracción), b) La presencia de un exceso de flores permite a la planta abortar selectivamente frutos de "mala calidad" (hipótesis de aborto selectivo), c) Aunque algunas plantas de la población son morfológicamente hermafroditas, pueden actuar como donadoras de polen (hipótesis de función masculina), d) El exceso de flores permiten a la planta explotar de forma inesperada condiciones favorables en términos de disponibilidad de recursos (hipótesis de disponibilidad de recursos), e) El exceso de flores pueden constituir una fuente de reserva de ovarios en el caso de que ocurra una alta mortalidad durante el período de floración (hipótesis de reserva de ovario). Los resultados de este trabajo aportan evidencia para la hipótesis de aborto selectivo, en el sentido de que hubo mayor aborto de frutos con los tratamientos de autopolinización espontánea y geitonogamia que con el tratamiento de xenogamia, lo sugiere que

hay una selección de frutos provenientes de entrecruzamiento. Además se estimó una alta depresión por endogamia en las dos poblaciones estudiadas (Guachetá=0,50; San Miguel=0,83).

Según Lande & Schemske (1985), la dirección en que evolucionan los sistemas de reproducción depende del nivel de depresión por endogamia. Si esta es menor del 50% se favorece la autogamia, pero si es superior a este valor se favorece el entrecruzamiento. Por lo tanto, la depresión por endogamia es la mayor fuerza que se opone a la evolución de los sistemas de autopolinización (Charlesworth & Charlesworth 1987). Los efectos negativos de la endogamia sobre el aborto de frutos estarían en línea con la "hipótesis del aborto selectivo", lo que sugiere que *V. meridionale* produce exceso de flores para permitir el aborto de frutos de autopolinización. El aborto selectivo de frutos se ha registrado para otras especies que también producen grandes cantidades de flores y frutos en baya, como *Prunus mahaleb* (Guitian 1994, Pflugshaupt *et al.* 2002) y *Vaccinium macrocarpon* (Brown & McNeil 2006) y se considera una estrategia para optimizar el esfuerzo reproductivo y no necesariamente debido a una insuficiente polinización. Aunque hay acuerdo general en que los bajos niveles de producción de frutos se relacionan con altos costos de producción de frutos. Con lo anterior también se aporta evidencia para la hipótesis de "aumento en la probabilidad de polinización" en especies de alta montaña, que sugiere que las especies en vez de evolucionar en la dirección de la autogamia, adquirirían un conjunto de rasgos que les permitirían mantener la fecundación cruzada (Torres-Díaz *et al.* 2011).

Las altas tasas de aborto puede ser también consecuencia de mecanismos de auto-incompatibilidad que se dan de forma tardía a nivel de ovario durante la división del cigoto (Seavey & Bawa 1986). Hay autopolinización, crecimiento normal de tubos polínicos en el estilo y estos alcanzan los óvulos tan rápido como los de polinización cruzada. Se da la fertilización y se inicia el desarrollo del endospermo, pero la división del cigoto falla y ocurre la degeneración del endospermo y del saco embrionario. Esto puede ocurrir semanas después de la polinización. En ericáceas solamente se ha registrado incompatibilidad tardía en *Rhododendron* (Seavey & Bawa 1986), en otras especies se ha determinado que corresponde a mecanismos de depresión por endogamia temprana que ocurren durante el desarrollo del embrión. En general se considera común la depresión por endogamia en Ericaceae, debido a que son perennes y muchas son clonales, como las especies del género *Vaccinium*. Se han demostrado depresión por endogamia temprana (aborto de frutos y semillas) en *Kalmia latifolia* (Rathcke & Real 1993), *Calluna vulgaris* (Mahy y Jacquemart 1999) y varias especies dentro del género *Vaccinium* (*V. angustifolium*, *V. corymbosum*, *V. myrtilloides*, *V.*

myrtillus, *V. vitis-idaea*) (Krebs y Hancock 1990, 1991, Guillaume & Jacquemart 1999, Hokanson & Hancock 2000, Raspé *et al.* 2004, Nuortila *et al.* 2006).

La clonalidad puede aumentar la depresión por endogamia dado que hay una mayor probabilidad de autogamia por medio de geitonogamia. La clonalidad da lugar a la producción de ramets, es decir, unidades potencialmente independientes que son genéticamente idénticas a la planta progenitora (genet). En consecuencia, la expansión de clones en especies xenógamas (que se entrecruzan) representara una desventaja en comparación con la expansión de clones en las especies autogamas (que pueden autocruzarse), ya que la propagación clonal puede interferir con los patrones de dispersión de polen, afectando las oportunidades de apareamiento de los genets (cruzas geitonogámicas intraramet e inter-ramet de un mismo genet) (Mandujano 2007). La geitonogamia en especies autoincompatibles resultaría en la nula producción de frutos y semillas, mientras que en las especies autocompatibles llevaría a una reducción en la producción de frutos y semillas por depresión endogámica. Por lo tanto, una posible razón para la baja producción de frutos con polinización abierta en la localidad de San Miguel fue alto flujo de polen genéticamente similar entre los individuos de la población y/o por la baja autocompatibilidad expresada por *V. meridionale* en esta localidad (0,17). Según los resultados de la tasa de autogamia y la depresión por endogamia (0,74 y 0,83, respectivamente) ambas eventos pudieron haber ocurrido, ya sea por autopolinización facilitada por polinizadores (geitonogamia, autogamia) y/o por autopolinización autónoma (Lloyd & Schoen 1992). Según el índice de autofertilidad (Guachetá=0,71, San Miguel=0,99) la especie puede autopolinizarse en ausencia de polinizadores y con la exclusión de polinizadores se obtuvo formación de frutos. Igualmente, se ha observado que cuando una abeja (*A. mellifera*, *B. hortulanus*) visita una flor en busca de néctar, el polen sale fácilmente y queda en el estigma (autogamia facilitada) y antes de abandonar un arbusto puede visitar cientos de flores (principalmente *B. hortulanus*, 15 flores/minuto). Se conoce que los abejorros del género *Bombus*, causan altos niveles de geitonogamia en plantas con grandes despliegues florales (Klinkhamer *et al.* 1994; Mitchell *et al.* 2004), por lo que esta forma de autopolinización puede estar contribuyendo de forma significativa a la tasa de autogamia en *V. meridionale*.

Otro aspecto que indica que *V. meridionale* busca promover el entrecruzamiento y disminuir la autogamia, fue el registro en las dos poblaciones estudiadas de plantas con flores morfológicamente hermafroditas pero funcionalmente femeninas. En otras palabras, plantas con esterilidad masculina. Cuando esta mutación se mantiene en una población y se encuentran plantas “femeninas” junto con plantas hermafroditas, la población se denomina ginodioica. La ginodioecia ya se ha registrado para

otras ericáceas como *Gaultheria* en Nueva Zelanda (9 especies, Delph *et al.* 2006), *Pernettya postrata* en Ecuador (Middleton 1991), *Leucopogon melaleuroides* en Australia (Vaughton & Ramsey 2011) y *Vaccinium angustifolium* (Myra *et al.* 2004, Bell *et al.* 2012). La frecuencia estimada ($17\pm 3\%$) de plantas femeninas en las dos poblaciones de *V. meridionale* es similar a la registrada para las especies de ericaceae mencionadas anteriormente. La ginodioecia se considera un estado de transición hacia la dioecia (separación de sexos) y las condiciones más favorables para su establecimiento se dan cuando hay una alta tasa de autogamia y de depresión por endogamia y un incremento en la producción de óvulos por las plantas femeninas (Charlesworth & Charlesworth 1978). De acuerdo con los resultados de este trabajo las dos primeras condiciones se presentan en *V. meridionale* y además se observó que en las plantas femeninas hay una alta retención de frutos. Una planta con esterilidad masculina puede establecerse en la población si compensa de alguna manera su falta de producción de polen. Se ha propuesto que con esterilidad una planta puede incrementar la producción de óvulos, como resultado de la asignación de los recursos disponibles para la reproducción (Charlesworth y Charlesworth 1978). Además se ha argumentado que una mutación hacia la esterilidad masculina libera la planta de los efectos negativos de geitonogamia sobre la producción de frutos. Por lo tanto un aumento en la producción de frutos en plantas con esterilidad masculina puede ser debido tanto a la reducción de la geitonogamia y a los costos ahorrados en la producción de polen. Además debido a que las plantas femeninas son incapaces de autopolinizarse, son menos propensas a experimentar endogamia comparada con las plantas hermafroditas. En consecuencia una severa depresión endogámica podría conferir una ventaja selectiva para las plantas femeninas y así contribuir a su permanencia en las poblaciones naturales (Ashman 2006).

El tipo de polinización (autopolinización, polinización cruzada) parece no tener relación con las características de los frutos y semillas en *V. meridionale*. Incluso con apomixis se obtuvieron similares a los registrados con polinización abierta y polinización manual externa (xenogamia). Aunque con este último tratamiento se obtuvieron frutos y semillas de mayor tamaño, la diferencia con respecto a los otros tratamientos no fue lo suficiente grande para afirmar que el origen del polen si tiene un efecto positivo o negativo sobre estas características. En un estudio de 20 poblaciones de *V. meridionale* el tamaño del fruto no mostró variación fenotípica, por lo que se considera que está determinado genéticamente y no por el ambiente (Ligarreto *et al.* 2011). Igualmente el tamaño de las semillas podría relacionado con el número de semillas y el espacio para su desarrollo dentro del fruto (Castro *et al.* 2012).

Limitación de polen. En las dos localidades estudiadas no se registró un incremento en la retención de frutos con suplementación de polen a flores expuestas a polinizadores. De acuerdo con esto la especie no enfrenta limitación de polen. Este resultado se confirmó con el índice de limitación de polen, aunque para la localidad de San Miguel parece hacer cierto grado de limitación de polen ya que con el índice se obtuvo un valor de 0,29 y la retención de frutos fue menor en flores expuestas a polinizadores sin suplementación de polen. Estos resultados concuerdan con los niveles de autocompatibilidad estimados para las dos poblaciones, en San Miguel fue más baja que en Guachetá, ya que se considera que cuando la especie es autocompatible es menos sensible a una limitación de polen gracias a que esta puede ser mitigada con la autopolinización, como mecanismo de aseguramiento reproductivo (Larson & Barrett 2000).

La retención de frutos fue más alta en Guachetá que en San Miguel, lo cual podría indicar limitación de polen, no solo por cantidad sino también por calidad. Con los experimentos de polinización se observó que cuando se limitó la entrada de polinizadores, se emasculó la flor y solamente se polinizó con polen externo, se registró menos aborto de frutos comparado con autopolinización espontánea y con geitonogamia. Por lo tanto, la limitación estaría dada por una insuficiente deposición de polen externo, genéticamente diferente de la población (Chacoff *et al.* 2008). Cuando las flores están expuestas a polinizadores pueden recibir cargas mixtas de polen, tanto de polen propio como de polen externo, pero si el polen externo es similar al de la propia planta debido a que no hay suficiente variación genética en la población por la clonalidad, se aumentaría la tasa de autogamia y en consecuencia el aborto de frutos por depresión por endogamia.

1.5 Conclusiones

La producción de frutos y semillas en *V. meridionale* no depende exclusivamente de los polinizadores ya que la especie puede asegurar su reproducción por autogamia y agamosperma. No obstante, en el agraz se observó una fuerte depresión por endogamia, lo que indica que hay un proceso de selección natural y sexual para disminuir la autogamia y favorecer el entrecruzamiento. Esto se refleja en mecanismos florales para atraer polinizadores (grandes despliegue floral, larga longevidad floral y sesgo en la producción de néctar hacia función femenina) y evitar la interferencia entre las funciones sexuales (dicogamia y hercogamia). Igualmente las poblaciones se encuentran bajo un proceso de ginodioecia, como proceso para evitar los efectos deletéreos de la depresión por endogamia y aumentar el éxito reproductivo femenino (producción de frutos y semillas) y masculino (trasferencia de polen).

De acuerdo con lo anterior los polinizadores son fundamentales para la reproducción de *V. meridionale* ya que pueden aumentar la tasa de exocruzamiento y así contribuir con el mantenimiento de la variabilidad genética de la población. Sin embargo su función va a depender de la variabilidad genética intrapoblacional que puede verse afectada naturalmente por el crecimiento clonal de la especie (Albert *et al.* 2008) pero disminuida por la fragmentación y procesos extractivos no sostenibles (Medina *et al.* 2009). Entonces el potencial productivo de las plantas estaría limitado por los polinizadores si estos no depositan polen externo diferente de la planta que visitan. Si esto no ocurre se disminuye la producción por aborto selectivo de frutos. Para obtener una buena producción de agraz se hace necesario conservar la variabilidad genética de las poblaciones y los polinizadores que permitan un flujo de polen dentro y entre estas.

Tabla 1-1. Resumen de las características morfológicas y funcionales de flor de *Vaccinium meridionale* en sus dos fases florales. Los valores son promedio \pm error estándar. Se presenta resultados de las prueba t o de Mann-Whitney (Z). Valores marcados con * son significativos a $p < 0,001$, ns=no significativo.

Rasgo floral	Fase masculina	Fase homógama con hercogamia	
Distancia antera-estigma (mm)	0,54 \pm 0,03	0,98 \pm 0,05	t= -7,40*
Viabilidad de polen (%)	58,3 \pm 3,5	54,9 \pm 4,3	t= 0,64 ns
Receptividad estigma (# tubos polínicos)	18,0 \pm 2	31 \pm 2	t= -4,09*
Volumen (μ L)	1,4 \pm 0,2	5,1 \pm 0,6	Z=-6,61*
Brix (%)	20,0 \pm 2,2	42,7 \pm 1,8	Z=-5,63*
Azúcar (mg)	0,43 \pm 0,07	2,83 \pm 0,38	Z=-6,79*

Tabla 1-2. Retención inicial y final y proporción de frutos para los tratamientos de biología reproductiva evaluados en dos poblaciones de *Vaccinium meridionale*. Se presenta promedio \pm error estándar. Valores marcados con la misma letra en la misma columna de la localidad no son estadísticamente diferentes (Kruskal Wallis, comparaciones múltiples de rangos medios, $p < 0,05$). Se indica el número de flores utilizadas para cada tratamiento.

Localidad/Tratamiento	Flores	Inicial	Final	Abortados
Guachetá (Subtotal)	3931	0,24\pm0,27	0,14\pm0,18	0,31\pm0,36
Apomixis con estigmas	512	0,41 \pm 0,06a	0,19 \pm 0,04a	0,41 \pm 0,10a
Autopolinización espontánea	963	0,24 \pm 0,05ab	0,11 \pm 0,02a	0,38 \pm 0,09a
Polinización Abierta	1727	0,23 \pm 0,06ab	0,15 \pm 0,05a	0,38 \pm 0,09a
Geitonogamia	303	0,11 \pm 0,04b	0,07 \pm 0,03a	0,14 \pm 0,10a
Xenogamia	426	0,19 \pm 0,05ab	0,15 \pm 0,04a	0,15 \pm 0,05a
San Miguel (Subtotal)	2876	0,22\pm0,25	0,09\pm0,15	0,64\pm0,35
Apomixis con estigmas	566	0,34 \pm 0,05ab	0,15 \pm 0,04a	0,59 \pm 0,06a
Apomixis sin estigmas	480	0,19 \pm 0,05bc	0,07 \pm 0,03ab	0,75 \pm 0,10a
Autopolinización espontánea	480	0,44 \pm 0,05a	0,12 \pm 0,03a	0,73 \pm 0,07a
Polinización abierta	480	0,07 \pm 0,05c	0,04 \pm 0,04b	0,72 \pm 0,24a
Geitonogamia	390	0,07 \pm 0,03c	0,02 \pm 0,01b	0,70 \pm 0,15a
Xenogamia	480	0,17 \pm 0,07bc	0,12 \pm 0,06ab	0,39 \pm 0,14a
Total	6807	0,23\pm0,26	0,12\pm0,17	0,46\pm0,39

Tabla 1-3. Características de frutos y semillas obtenidos con los diferentes tratamientos de biología reproductiva evaluados en *Vaccinium meridionale*. R=Número de ramas en las cuales se registró producción. N= número de frutos medidos. Se presenta el promedio (\pm error estándar) agrupado de las ramas.

Localidad/tratamiento	R	N	Peso	Alto	Ancho	# Sem	Ancho Semillas	Alto Semillas
Guachetá								
Apomixis con estigmas	13	86	0,22 \pm 0,02	6,16 \pm 0,22	7,01 \pm 0,25	24 \pm 3	1,00 \pm 0,03	1,37 \pm 0,04
Autopolinización espontánea	12	78	0,23 \pm 0,03	6,20 \pm 0,32	7,17 \pm 0,40	22 \pm 3	0,99 \pm 0,02	1,45 \pm 0,04
Polinización Abierta	13	92	0,20 \pm 0,03	5,87 \pm 0,28	6,78 \pm 0,32	18 \pm 3	1,00 \pm 0,03	1,45 \pm 0,04
Geitonogamia	8	24	0,21 \pm 0,05	5,99 \pm 0,55	6,78 \pm 0,55	20 \pm 3	0,94 \pm 0,04	1,39 \pm 0,08
Xenogamia	12	60	0,28 \pm 0,03	6,80 \pm 0,29	7,84 \pm 0,32	16 \pm 3	1,02 \pm 0,03	1,49 \pm 0,03
San Miguel								
Apomixis con estigmas	13	47	0,26 \pm 0,04	6,61 \pm 0,35	7,30 \pm 0,35	28 \pm 2	0,95 \pm 0,02	1,37 \pm 0,04
Apomixis sin estigmas	6	22	0,32 \pm 0,05	7,28 \pm 0,52	7,75 \pm 0,57	27 \pm 2	1,01 \pm 0,03	1,42 \pm 0,05
Autopolinización espontánea	10	41	0,26 \pm 0,03	6,62 \pm 0,35	7,27 \pm 0,33	23 \pm 3	0,96 \pm 0,03	1,32 \pm 0,05
Polinización abierta	1	6	0,21	6,60	6,98	46	0,85	1,20
Geitonogamia	4	16	0,32 \pm 0,07	7,17 \pm 0,77	7,92 \pm 0,66	24 \pm 7	0,99 \pm 0,09	1,41 \pm 0,12
Xenogamia	5	21	0,34 \pm 0,11	7,14 \pm 0,63	7,86 \pm 0,84	28 \pm 5	1,07 \pm 0,10	1,38 \pm 0,08

Tabla 1-4. Resultados del análisis de varianza para evaluar diferencias en la producción y aborto de frutos provenientes de polinización abierta con y sin suplementación de polen en dos poblaciones de *Vaccinium meridionale*. Se presenta promedio \pm error estándar agrupado de las ramas.

Variable	Factor	gl	F	p	Sin Suplementación		Con Suplementación	
					Guachetá	San Miguel	Guachetá	San Miguel
Inicial	Localidad		2,76	0,104				
	Tratamiento	1; 41	0,01	0,944	0,23 \pm 0,10	0,12 \pm 0,10	0,20 \pm 0,09	0,13 \pm 0,11
	Localidad*Tratamiento		0,05	0,830				
Final	Localidad		3,05	0,09				
	Tratamiento	1; 41	0,00	0,96	0,15 \pm 0,07	0,08 \pm 0,08	0,16 \pm 0,07	0,06 \pm 0,06
	Localidad*Tratamiento		0,04	0,85				
Abortados	Localidad		0,28	0,605				
	Tratamiento	1; 20	0,71	0,408	0,41 \pm 0,12	0,58 \pm 0,42	0,23 \pm 0,14	0,69 \pm 0,20
	Localidad*Tratamiento		3,19	0,089				

gl=grados de libertad del factor; grados de libertad del error.

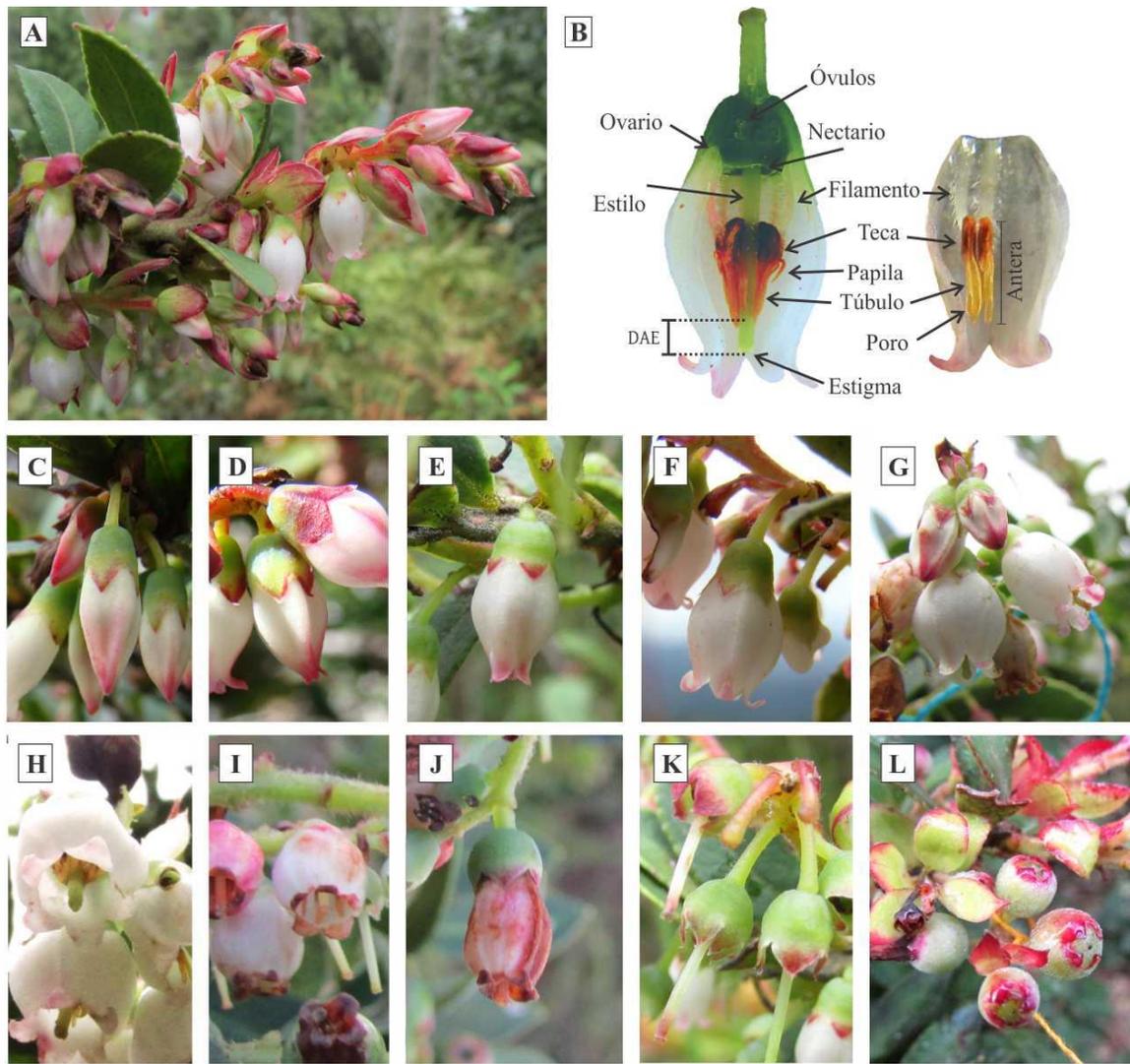


Figura 1-1. Inflorescencia (A), morfología (B), estados de apertura (C. Botón floral, D. Recto, E. Inclinado, F-H. Curvada) y senescencia (I-J) de la flor de *Vaccinium meridionale*. Desarrollo del fruto después de polinización a los 8 días (K) y tres semanas (L).

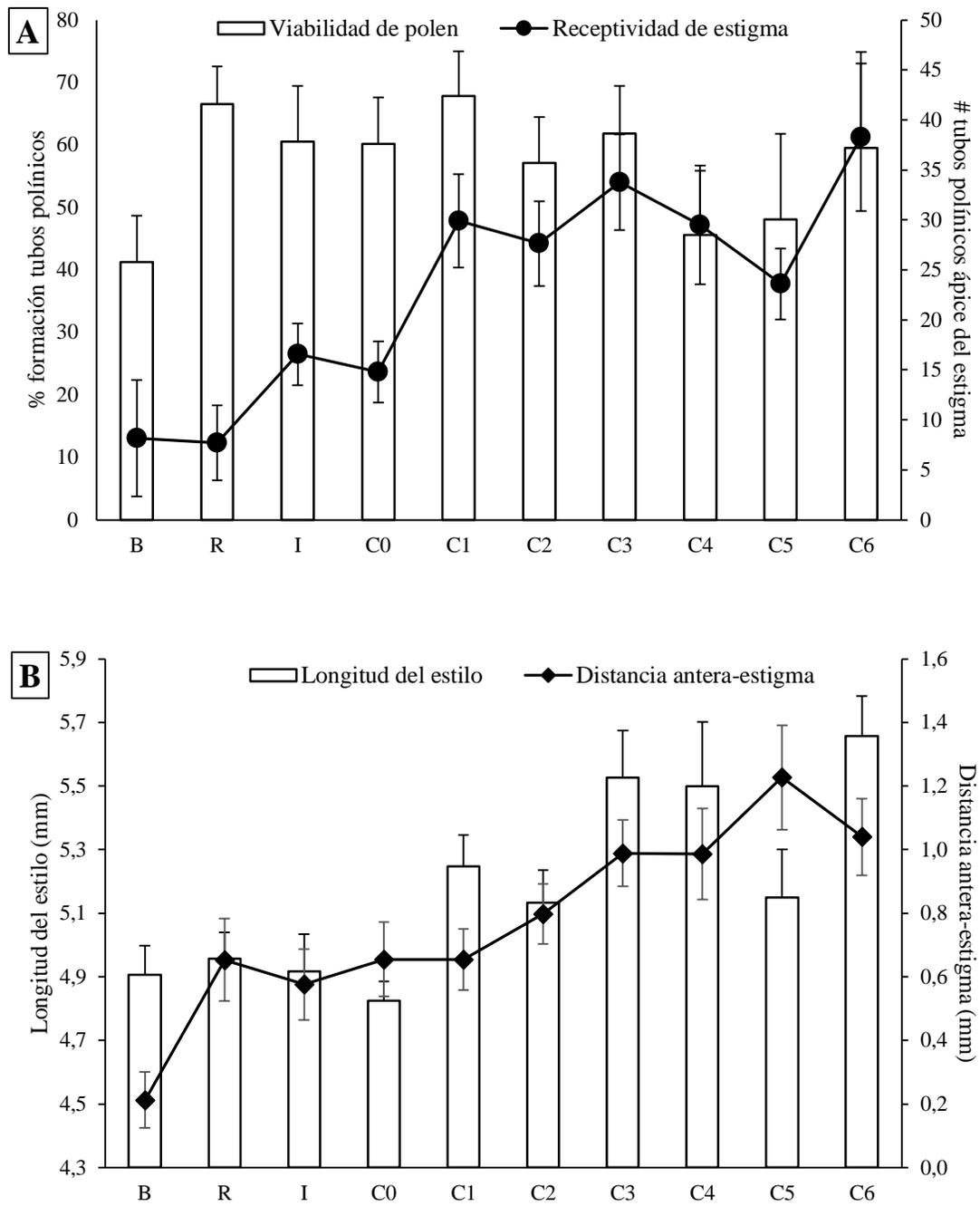


Figura 1-2. Características funcionales (A. Receptividad de estigma y Viabilidad de polen) y morfológicas (B. longitud del estilo y Distancia antera-estigma) de la flor de *Vaccinium meridionale* en diferentes estados de apertura de la flor. Se indican el promedio \pm error estándar.

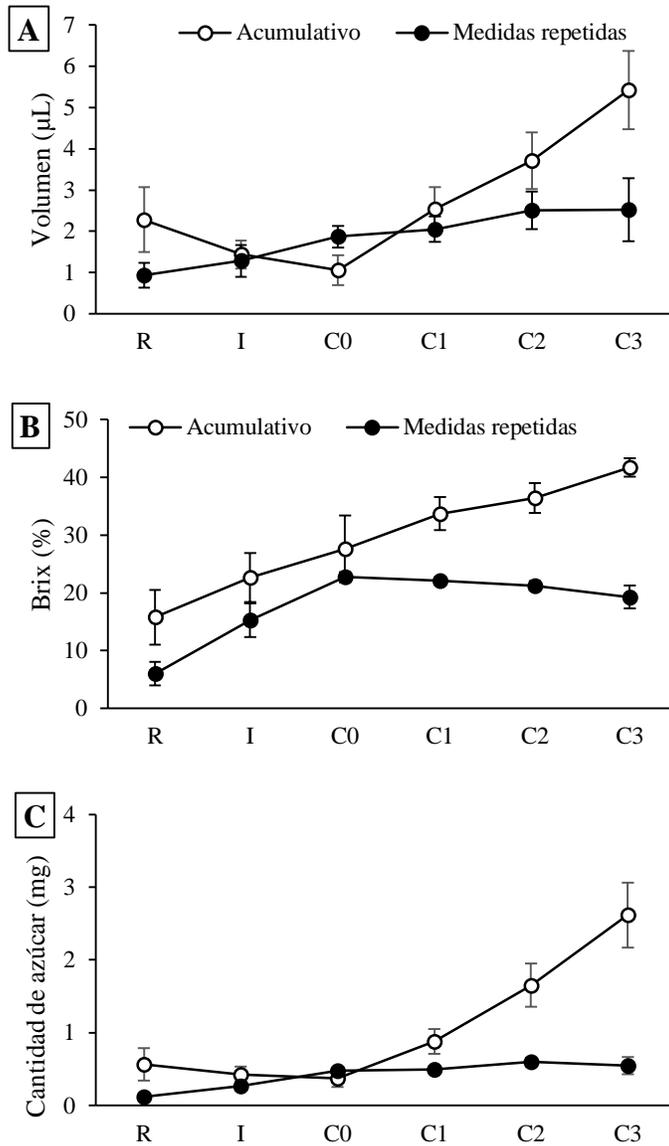


Figura 1-3. Cambios en el volumen (A) concentración (B) y cantidad de azúcar (C) del néctar de *Vaccinium meridionale* en diferentes estados de apertura de la flor, evaluados por medidas repetidas (varias medidas del mismo grupo de flores) y acumulativo (cada medida en diferentes grupos de flores y en diferentes momentos). Se presenta promedio (\pm error estándar).

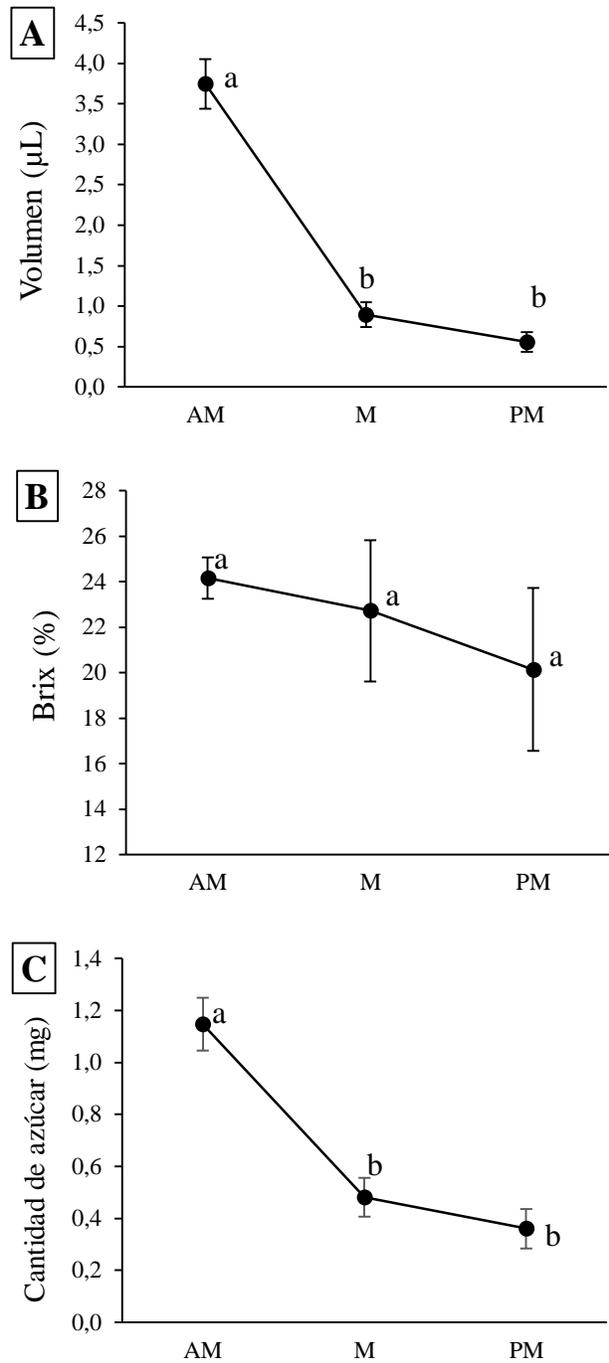


Figura 1-4. Efecto de la primera remoción en el día sobre el volumen (A), concentración (B) y cantidad de azúcar (C) en el néctar de *Vaccinium meridionale*. Valores marcados con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Kruskal Wallis seguido por comparaciones múltiples de rangos medios, $p < 0,05$). Se presenta promedio (\pm error estándar).

2. Eficiencia de polinización y efecto de la presencia de colmenas de *Apis mellifera* sobre la producción de frutos de agraz *Vaccinium meridionale*

2.1 Introducción

El servicio de polinización, además del beneficio económico derivado de la comercialización de los productos apícolas, es uno de los principales argumentos para promover la apicultura en programas de conservación de biodiversidad y manejo de recursos naturales, dado que las abejas durante la recolección de néctar y polen pueden polinizar plantas en el medio natural y en consecuencia contribuir con la regeneración de las coberturas naturales (Brown 2001). Además las abejas pueden polinizar plantas silvestres y/o cultivadas cuya producción de frutos puede ser importante para las comunidades locales (Jacobs *et al.* 2006) o para el sostenimiento de fauna nativa amenazada (Cayuela *et al.* 2011). Igualmente si los productos apícolas tienen su origen en los árboles y/o coberturas boscosas estos pueden ser promovidos como productos forestales no maderables (PFNM). El reconocimiento de los productos apícolas como PFNM y de impactos positivos como la polinización, permite considerar a la apicultura como actividad productiva compatible con la conservación de biodiversidad. No obstante, en un contexto geográfico donde *Apis mellifera* es una especie exótica se debe considerar su impacto ecológico.

Apis mellifera es una especie nativa del viejo mundo (África, Europa y Asia suroccidental) pero ha sido ampliamente introducida en diferentes regiones del planeta por fines económicos (incrementar las cosechas de algunas especies cultivadas, y sobre todo para la producción de cera y miel), y hoy en día está distribuida en prácticamente todo el planeta. Estas abejas sociales están consideradas como polinizadores altamente poliléticos o generalistas (i.e. visitan una gran variedad de plantas), son muy eficientes a la hora de coleccionar néctar/polen, su domesticación es relativamente sencilla y además pueden alcanzar altas densidades poblacionales (Goulson 2003, Moritz *et al.* 2005). Sin embargo, estas mismas características han llevado a cuestionar, revisar y debatir el impacto

ecológico de *A. mellifera* sobre la fauna y flora nativa (Butz 1997, Goulson 2003, Paini 2004, Moritz *et al.* 2005, Roubik 2009), con resultados contrastantes. Hay estudios que muestran que las abejas no afectan o son benéficas para la polinización de plantas nativas, especialmente para aquellas en zonas fragmentadas donde los polinizadores nativos han disminuido por la pérdida de hábitats (Dick 2003, Caraballo-Ortiz & Santiago-Valentín 2011). Sin embargo, otros estudios muestran que *A. mellifera* tiene impactos negativos sobre el éxito reproductivo de plantas nativas, dado que desplazan a los polinizadores nativos y son polinizadores menos eficientes que estos, incluyendo otras abejas y aves (Gross & Mackay 1998, Hansen *et al.* 2002, Celebrezze & Paton 2004), o sencillamente es un parásito floral, el cual toma gran cantidad de recursos sin prestar un servicio, con posibles efectos sobre relaciones de polinización entre las plantas y los polinizadores nativos. Aunque se ha demostrado que el impacto de *A. mellifera* sobre los polinizadores no siempre es negativo, ya que estos pueden cambiar sus preferencias florales y buscar recursos alimenticios alternativos (Roubik 2009). De acuerdo con lo anterior, para evaluar adecuadamente el potencial de la apicultura como alternativa productiva para fortalecer programas de conservación de biodiversidad es necesario determinar la importancia de *A. mellifera* como polinizador del medio natural.

Entre las principales características a considerar para evaluar la importancia de *A. mellifera* como polinizador se encuentran su eficiencia de polinización y los efectos de altas densidades de abejas sobre el éxito reproductivo de la planta, directos (niveles de polinización y fructificación) e indirectos (monopolización de recursos para polinizadores nativos). La eficiencia de la polinización se define como la contribución de un polinizador al éxito reproductivo de una planta después de una sola visita a una unidad floral y se mide en términos de la cantidad de polen de la misma especie depositado sobre el estigma, formación de frutos y/o números de semillas (Sampson & Cane 2000, Gross 2001, Neves & Viana 2011). Los visitantes florales pueden variar en su eficiencia de la polinización por una diversas razones, ninguna de las cuales se excluyen entre sí, incluyendo su capacidad para recoger y depositar el polen, el grado en el cual se limpian el polen de sus cuerpos, y su comportamiento durante su visita a las flores (de visitantes legítimos a ladrones de recursos, de acuerdo a si su cuerpo entra o no en contacto directamente con las estructuras reproductivas) (Adler & Irwin 2006). Igualmente, la cantidad de polen removido o depositado en el estigma en una sola visita de un polinizador puede variar con la morfología floral. Se considera que flores que no presentan estructuras que restringen el acceso a los recursos y que mantienen sus órganos reproductivos expuestos a los visitantes son más fácilmente polinizadas por *A. mellifera* (Rosaceae, Myrtaceae). Sin embargo, las especies con atributos más especializados,

tales como las anteras poricidas, apenas son polinizadas por *A. mellifera*, ya que esta abeja no es capaz de vibrar los músculos de sus alas lo suficientemente fuerte para transferir vibraciones a las anteras y liberar el polen (Solanaceae, Melastomataceae) (Neves & Viana 2011).

En Colombia los bosques andinos de la Cordillera Oriental se reconocen como uno de los ecosistemas prioritarios para adelantar acciones tendientes a su manejo y conservación, debido entre otros aspectos, a que constituyen el hábitat para el roble *Quercus humboldtii* Bonpl. (Fagaceae), especie en estado vulnerable y con veda nacional para su aprovechamiento forestal (Rodríguez *et al.* 2005; Salinas & Cárdenas 2007). La apicultura se ha planteado como alternativa no maderable con alto potencial para ser integrada al manejo y conservación de los bosques andinos, dado que se han identificado productos apícolas (miel y polen) con origen botánico en el roble y en especies nativas presentes en los bosques y en los matorrales asociados a estos, que pueden ser promovidos como PFNM (Chamorro *et al.* 2013a, b). Sin embargo, no se conoce la importancia de *A. mellifera* como polinizador de las plantas nativas que dan origen a estos productos y ayudan a sostener los apiarios. La apicultura se da a pequeña escala pero los apiarios son fijos, por lo tanto en todas las épocas del año hay abejas recolectando néctar y polen de las coberturas naturales, para la producción de miel pero también de polen apícola.

Dentro de las especies potencialmente polinizadas por *A. mellifera* y que crecen en matorrales y bosque de roble se encuentra el agraz *Vaccinium meridionale* (Ericaceae), un arbusto de importancia ecológica (especie pionera e inductora de bosques) pero también económica (Ligarreto *et al.* 2011). Las comunidades rurales recolectan los frutos del agraz para su posterior comercialización en plazas de mercado locales o venta a intermediarios (Torres *et al.* 2009). Los frutos se usan para elaborar una gran variedad de productos como postres, vinos y mermeladas) y se ha determinado que presentan muy buenas propiedades nutraceuticas, principalmente antioxidantes (Garzón *et al.* 2010). Además los frutos tienen un alto potencial de exportación, ya que la especie ha sido incluida en la lista de especies que pueden ingresar al mercado de los Estados Unidos de América (Torres *et al.* 2009). *Vaccinium meridionale* presenta un sistema reproductivo mixto, produce frutos por agamospermia, autogamia y entrecruzamiento. No obstante, la especie busca promover el entrecruzamiento, dado que presenta rasgos florales para atraer un amplio grupo de polinizadores (anteras poricidas pero fácil liberación de polen, producción de néctar, gran despliegue floral, larga longevidad floral) y presenta una fuerte depresión por endogamia (Capítulo 1). La especie es visitada por diferentes grupos de insectos nativos (avispa, mariposas, polillas), pero los abejorros *Bombus hortulanus* son sus principales

polinizadores (Pinilla 2013). En el contexto anterior, los objetivos de este trabajo fueron 1) Evaluar la eficiencia de *A. mellifera* como polinizador del agraz con relación a *B. hortulanus* y, 2) Evaluar el efecto de la presencia de colmenas de *A. mellifera* sobre los niveles de polinización y fructificación del agraz; con fin de aportar a la valoración de la apicultura como alternativa productiva que puede ser integrada al manejo y conservación de biodiversidad en paisajes andinos con bosques de roble.

2.2 Materiales y métodos

Área de estudio. El estudio se realizó en la vertiente occidental de la cordillera Oriental de Colombia, en territorios de los municipios de Chiquinquirá (Boyacá), Guachetá (Cundinamarca) y San Miguel de Sema (Boyacá), que hacen parte de la cuenca de la laguna de Fúquene. Comprende agro-ecosistemas andinos de montaña entre los 2500-3000 msnm, donde el agraz crece de forma silvestre en áreas en regeneración y en bosques de roble. En general el agraz crece acompañado de otras especies de flora nativa (*Gaiadendrom punctatum*, *Hesperomeles goudotiana*, *Miconia squamulosa*, *Monochaetum myrtoideum*, *Morella parvifolia*) que pueden ser más abundantes que este, aunque en algunos sitios se realiza remoción de cobertura vegetal y el agraz crece junto con especies exóticas maderables (*Pinus patula*, *Eucalyptus globulus*). La precipitación media anual esta entre 1100 y 1300 mm y la temperatura media media anual entre 13 y 16°C (Muñoz *et al.* 2009). Los muestreos se realizaron en el año 2013, durante las principales floraciones (enero-marzo, junio-septiembre).

Eficiencia de polinización. Se evaluaron visitas únicas de *A. mellifera* y *B. hortulanus* (machos, obreras y reinas) para determinar cantidad de polen depositado en el estigma, formación de frutos, aborto de frutos y características de frutos (peso, ancho, alto, número de semillas). Para la deposición de polen se aislaron botones florales con bolsas de tul y cuando estos abrieron y llegaron a su estado de mayor receptividad estigmática (3 días después de abiertas), se removió la bolsa para exponer la flor a una sola visita de la abeja. Después de la visita se retiró la flor de la planta, se cortó el estigma, se colocó en una lámina portaobjetos con un trozo de gelatina coloreada con fucsina y se cubrió con una lámina cubreobjetos. La lámina se calentó y el cubreobjetos se presionó suavemente para extender el estigma y que se colorearan los granos de polen. En microscopio óptico a 20x, se contó el número de tétradas presentes en el estigma.

Para la formación de frutos, se marcaron ramas y en cada rama se removieron las flores abiertas y se dejaron solamente botones, los cuales se aislaron con una bolsa de tul. Cada rama marcada en una planta se tomó como una sola unidad floral (réplica). Tres días después se quitó la bolsa y la rama se expuso a una sola visita de la abeja. A medida que la abeja iba visitando una flor la corola se marcaba con un marcador y después de que la abeja se iba, las flores visitadas se marcaban con hilos, se contaban el número de flores visitadas y se colocaba nuevamente la bolsa. Tres semanas después se revisaron las ramas para registrar si ocurrió o no formación de frutos (retención inicial) y quince semanas después de la primera revisión se contaron los frutos cercanos a la madurez (retención final). Estos se retiraron de las ramas para medirlos con un calibrador (alto y ancho), pesarlos y contar el número de semillas. Para extraer las semillas, los frutos se maceraron suavemente y con ayuda de pinzas se separaron las semillas y se eliminaron los restos del pericarpio. Las semillas se midieron en microscopio óptico a 4x.

Efecto de la presencia de colmenas. Para esto se seleccionaron seis sitios de aprovechamiento de agraz (tres con colmenas y tres sin colmenas de *A. mellifera*), cada uno separado por más de 2km (Tabla 1). Los sitios se nombraron según el apellido del propietario de la finca: Jiménez, Bolívar, Sierra para los tres sitios con colmenas y González, Moreno y Peña para los sitios sin colmenas. En cada sitio se evaluó la densidad de floración del agraz, deposición de polen, densidad de visitantes florales y formación de frutos (con y sin exclusión de polinizadores). La densidad de floración y de visitantes florales se evaluó cuatro veces por sitio, cada 12 días. El diseño experimental y las variables medidas siguen las recomendaciones dadas por Vaissière *et al.* (2011).

Para evaluar la formación de frutos, en cada sitio se marcaron ocho plantas y en cada planta 50 racimos que se dejaron expuestos a los polinizadores (400 racimos por sitio). Adicionalmente en cuatro de estas plantas se marcaron 50 racimos (200 racimos por sitio), los cuales se aislaron de los polinizadores con bolsas de tul. Los racimos expuestos a polinizadores se usaron para evaluar la densidad de floración, para lo cual se contó el número de flores por racimo (botones y abiertas) y el número de racimos por planta. Con estos valores se calculó el número total de flores por planta. El primer conteo de flores se realizó cuando se colocaron las marcas. En ocho plantas cercanas a las plantas marcadas se estimó la densidad de visitantes florales por medio de la técnica de escaneo. Esta técnica consiste en registrar la cantidad de individuos de cada especie que se encuentra en las flores al momento de realizar la observación. En el agraz se revisaron 50 racimos por planta. Cinco meses después del primero conteo de flores, se contó el número de frutos formados por racimo (expuestos y embolsados) en las plantas marcadas.

En el primero muestreo de densidad de floración, se tomaron al azar 30 flores de cada planta marcada (diferentes de los racimos marcados) y se fijaron con FAA (Formol, Alcohol, Ácido Acético, Agua destilada en proporciones 10, 50, 5, 35, respectivamente) para realizar conteos de polen depositado en el estigma (240 flores por sitio). Los estigmas se sometieron a digestión con NaOH (8N) por dos horas a 60°C en baño maría y se colorearon con anilina azul. Los estigmas se colocaron en una lámina portaobjetos y se cubrieron con lámina cubreobjetos, la cual se presionó suavemente para extender el estigma y facilitar el conteo de polen (del agraz y de otras especies). En microscopio óptico a 40x, se contó el número de granos de polen en el estigma.

Análisis de datos. Se comparó la eficiencia de polinización entre *A. mellifera* y *B. hortulanus* a nivel de especie, dado que se obtuvieron pocos datos para las diferentes castas de *B. hortulanus* (machos, obreras y reinas). Sin embargo se presentan los valores obtenidos de las diferentes castas para fines comparativos. Se utilizó una prueba t de Student para comparar la cantidad promedio de polen depositado en el estigma por las dos especies. Esta variable cumplió con el supuesto de homogeneidad de varianzas (prueba de Levene, $p > 0,05$). También se compararon las dos especies de abejas con respecto a los frutos obtenidos de las visitas únicas. Las variables respuesta fueron: retención inicial, retención final, proporción de frutos abortados, peso (g), ancho (mm), alto (mm) y número de semillas. Dado que la unidad de análisis fue la rama, la retención inicial y final de frutos se expresó en términos de proporción: número de frutos formados en la rama/número de flores marcados en la rama. Con base en la proporción inicial y final de frutos se calculó la proporción de frutos abortados (retención inicial-retención final/retención inicial). Los datos de peso, alto, ancho, número de semillas de los frutos se agruparon por replica (rama) de cada tratamiento. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar la retención inicial, final y proporción de frutos abortados, debido a que los datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza (prueba de Levene, $p < 0,05$). Las variables de peso, ancho, alto y número de semillas cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se utilizó una prueba t de Student.

En cuanto al efecto de la presencia de colmenas, las variables respuesta fueron: densidad de abejas melíferas, densidad de polinizadores nativos, deposición de polen (número de granos de polen en el estigma) y formación de frutos. Se utilizó una prueba t de Student para comparar la densidad promedio de abejas melíferas y polinizadores nativos entre los sitios con colmenas y sin colmenas. Ambas variables cumplieron con la prueba de homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene,

$p > 0,05$). La deposición promedio de polen en el estigma en los sitios con colmenas se comparó con la de los sitios sin colmenas con la prueba U de Mann-Whitney, dado que la datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene, $p < 0,05$). La formación de frutos se expresó en términos de proporción para cada racimo: número de frutos en el racimo/número máximo de flores registrado en un racimo en la planta. Estos datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza (análisis de residuos, prueba de Levene $p < 0,05$), por lo que se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de rangos medios (Siegel & Castellan 1988) para identificar diferencias entre tratamientos (racimos expuestos de sitios con colmenas, racimos embolsados de sitios con colmenas, racimos expuestos de sitios sin colmenas, racimos embolsados de sitios sin colmenas). Se calcularon correlaciones de Spearman entre las variables anteriores, para lo cual los datos de todas las variables se resumieron (promedio) a nivel de planta. Todos los análisis estadísticos se realizaron en STATISTICA 10 (StatSoft 2011).

2.3 Resultados

Eficiencia de polinización. La deposición de polen no difirió entre *A. mellifera* y *B. hortulanus* (Tabla 2). Asimismo tampoco se encontraron diferencias en la formación ni en el aborto de frutos (Tabla 3). Inicialmente con *A. mellifera* se registró mayor retención de frutos pero las tasas de aborto compensaron estas diferencias y la formación de frutos fue similar con las dos especies. Sin embargo, hay que destacar que con visitas únicas de reinas y machos de *B. hortulanus* la tasa de aborto de frutos fue menor comparado con las obreras y *A. mellifera*, las cuales presentaron proporciones similares (Tabla 3). Como especie *B. hortulanus* no difirió de *A. mellifera* pero cuando se consideran diferencias a nivel de castas, las visitas únicas de reinas de *B. hortulanus* presentaron mayor retención de frutos tanto inicial como final (Tabla 3). Con respecto a la características de los frutos, tampoco se encontraron diferencias pero las visitas únicas de *B. hortulanus* resultaron en frutos de mayor tamaño y peso (Tabla 4). El número de semillas no difirió entre *A. mellifera* y *B. hortulanus*, pero con visitas únicas de reinas y machos se obtuvo el mayor número de semillas (Tabla 4).

Efecto de la presencia de colmenas. En total se registraron 1711 insectos visitando las flores de *V. meridionale*, de los cuales 89,5% de los registros corresponden a *A. mellifera* y 10,5% corresponden a polinizadores nativos. Dentro de los polinizadores nativos se definieron tres grupos: *B. hortulanus* (machos, obreras, reinas), *Bombus atratus* (machos, obreras, reinas), otras abejas (*Bombus* sp., *Thygater*, Halictidae) y otros insectos (dípteros, lepidópteros: mariposas y

polillas e himenópteros: avispas) (Tabla 5, Fig. 1). Por su abundancia se destacaron los machos de *B. hortulanus* y *B. atratus* y abejas de la familia Halictidae.

La densidad de *A. mellifera* difirió entre los sitios con y sin colmenas, aunque en una de localidades sin colmenas (González) la densidad fue cercana a los sitios con colmenas (Tabla 6). En general la densidad de polinizadores nativos no difirió entre sitios con colmenas y sin colmenas. No obstante, en dos de los sitios sin colmenas (González y Moreno) se registraron altas densidades de polinizadores nativos, en la localidad González principalmente abejas de la familia Halictidae y en la localidad Moreno, machos de *B. hortulanus* y *B. atratus* (Tabla 5 y 6). No se encontró relación entre la densidad de *A. mellifera* y polinizadores nativos ($r=0,23$; $p=0,11$), sin embargo cuando se considera su densidad con relación a la cantidad de flores disponibles esta se mantiene relativamente alta, superando hasta por tres veces la densidad promedio de los polinizadores nativos. Un arbusto produce en promedio 385 ± 116 racimos y 12 ± 3 flores por racimo a lo largo de su floración, con un máximo de floración (1128 ± 1020 flores por planta) al inicio del periodo de floral que disminuye a medida que avanza la floración (Figura 2). También se observó que cuando disminuye la densidad de *A. mellifera* aumenta la de polinizadores nativos o cuando la densidad de *A. mellifera* aumenta la densidad de polinizadores nativos disminuye (Figura 2).

La deposición de polen no difirió entre sitios con y colmenas (Tabla 6) y no se registró polen de otras especies en los estigmas. Los sitios con altas densidades de *A. mellifera* y altas densidades de polinizadores nativos (Jiménez y González) presentaron los valores más altos de deposición de polen y estos fueron significativamente diferentes de los otros sitios (Tabla 6). En la localidad Sierra, donde hay colmenas de *A. mellifera*, se registró la más baja deposición de polen (Tabla 6). Sin embargo la deposición no se relacionó con la densidad de *A. mellifera* ($r=0,10$; $p=0,51$) pero sí con la densidad de polinizadores nativos aunque esta relación fue relativamente débil ($r=0,36$; $p=0,01$). La formación de frutos de racimos expuestos a polinizadores tampoco difirió entre sitios con y sin colmenas, pero sí se encontraron diferencias significativas cuando se considera la formación de frutos de racimos excluidos de polinizadores. En los sitios con colmenas la formación de frutos fue significativamente más alta en los racimos expuestos a polinizadores con respecto a los racimos excluidos de polinizadores a diferencia de los sitios sin colmenas donde la formación de frutos fue similar para los dos tratamientos (Tabla 6). En los sitios con mayor deposición de polen la producción de frutos fue baja (González y Jiménez) y en el sitio con menor deposición de polen (Sierra) la producción de frutos fue más alta, por tal motivo se encontró una relación negativa moderadamente fuerte entre la deposición de polen y la producción de frutos ($r=-$

0,62; $p=0,00$). No se encontró relación significativa entre la densidad de polinizadores y la producción de frutos (*A. mellifera*: $r=-0,03$; $p=0,83$; Polinizadores nativos: $r=-0,23$; $p=0,12$).

2.4 Discusión

Las comparaciones entre la cantidad de polen depositado por *A. mellifera* y *B. hortulanus*, así como de las características de los frutos obtenidos de las visitas únicas, muestran que las dos especies son polinizadores eficientes de *V. meridionale*. Estos resultados están de acuerdo con lo registrado para *Vaccinium ashei* (variedades “Climax” y “Premier”), para la cual *A. mellifera* es igual de eficiente que las abejas silvestres *Habropoda laboriosa* y *Osmia ribifloris* (Sampson y Cane 2000). No obstante, los resultados son en general contrastantes con los obtenidos para otras especies de *Vaccinium*. Javorek *et al.* (2002), en su trabajo para evaluar la eficiencia de polinización de diferentes especies de abejas visitantes del arándano bajo (*Vaccinium angustifolium*), encontraron que *Bombus* y *Andrena* son más eficientes en la deposición de polen que *A. mellifera*. Con una sola visita de una abeja nativa se forma fruto, mientras que se requieren múltiples visitas de abejas melíferas para obtener el mismo resultado. Igualmente para *V. ashei* (variedad “Tifblue”), *A. mellifera* es menos eficiente comparada con las abejas nativas (Sampson y Cane 2000). También en *V. corymbosum* una sola visita de un abejorro es equivalente a cuatro visitas de abejas melíferas (Dogterom 1999). El principal argumento para explicar la baja eficiencia de *A. mellifera* en las especies de *Vaccinium* es su incapacidad para hacer vibrar las flores y liberar el polen. No obstante, en *V. meridionale* esto no constituye un factor limitante ya que el polen sale fácilmente sin vibración. Por lo tanto, los resultados de este trabajo aportan evidencia para la hipótesis de que la polinización en *V. meridionale* no estaría limitada a los insectos que hacen polinización por vibración, sino que se amplía el espectro de visitantes florales, que también pueden actuar como polinizadores (Capítulo 1).

En el trabajo de Javorek *et al.* también se consideró la eficiencia de polinización de diferentes castas de *Bombus* (reinas y obreras) y se encontró que las obreras son menos eficientes que las reinas pero ambas castas son más eficientes que *A. mellifera*. Se requieren de tres a cuatro visitas de *A. mellifera* para que se deposite la misma cantidad de polen que deposita una reina de *Bombus* en una sola visita. En *V. meridionale* se obtuvieron pocos datos para visitas únicas de reinas de *B. hortulanus* pero se encontró que estas depositan menos cantidad de polen que las obreras y que *A. mellifera*. Sin embargo, la retención de frutos y el número de semillas fue más alta con las visitas únicas de reinas. Igualmente la proporción de frutos abortados fue menor con las visitas únicas de

reinas. Estos resultados sugieren la cantidad de polen no es factor importante en la eficiencia de polinización de los polinizadores de *V. meridionale* sino que haya deposición de polen de plantas diferentes y menor deposición de la misma flor, planta o ramet (individuos genéticamente idénticos a la planta progenitora) ya que *V. meridionale* es una especie clonal (Medina *et al.* 2009, Ligarreto *et al.* 2011). Las reinas serían más eficientes que las obreras debido a que permanecen menos tiempo en las plantas y en los parches de plantas y tienen mayores rangos de vuelo, por lo que pueden entrar en contacto con plantas genéticamente diferentes (Kudo *et al.* 2011). En su estudio con *Rhododendron aureum* (Ericaceae) Kudo *et al.* encontraron que la geitonogamia (polinización de flores de la misma planta) aumentó con una mayor actividad de las obreras ya que estas permanecen más tiempo en las flores y presentan distancias cortas de vuelo entre inflorescencias. Por otra parte varios autores consideran que *A. mellifera* puede aumentar la geitonogamia ya que visitan muchas flores en una misma planta particularmente en aquellas especies con grandes despliegues florales (Celebrezze & Paton 2004; Neves & Viana 2011), sin embargo no hay estudios específicos que evalúan su contribución a la tasa de autogamia. De acuerdo con lo anterior, la deposición de polen externo va a depender a su vez del movimiento y distancia de desplazamiento de los polinizadores, que en el caso de *V. meridionale* puede ser un factor crítico en su reproducción ya que la especie muestra una fuerte depresión por endogamia posiblemente asociado con altos niveles de polinización vía geitonogamia consecuencia de un gran despliegue y longevidad floral (Capítulo 1).

Apis mellifera fue el polinizador dominante de *V. meridionale* en todos los sitios estudiados y en todos los momentos de la floración del agraz, incluso cuando hay baja densidad floral. Si bien estos resultados no son suficientes para concluir que hay un impacto negativo de *A. mellifera* sobre los polinizadores nativos, si sugieren un monopolización del recurso por parte de esta abeja, lo que podría afectar a las poblaciones de polinizadores silvestres, en particular a los abejorros del género *Bombus* que son los más abundantes en las flores del agraz después de las abejas melíferas. El impacto de *A. mellifera* sobre los polinizadores nativos depende de la importancia del recurso para el sostenimiento de estos y de la capacidad que tengan los polinizadores nativos para encontrar recursos alternativos y que estos sean equivalentes al recurso monopolizado (Paini 2004, Roubik 2009). En caso contrario, una reducción en la cantidad de alimento podría reducir el éxito reproductivo de los polinizadores nativos y en consecuencia sus poblaciones (Paini 2004). Para el área de estudio la fundación de nuevos nidos de *B. hortulanus* coincide con la floración del agraz, lo cual indica que el recurso puede ser importante para este abejorro. No obstante durante esta época los abejorros también visitan de forma frecuente otras especies como *M. myrtoideum*, *M.*

squamulosa, *G. punctatum*, *Symplocos theiformes*, que son más abundantes que el agraz (Chamorro Obs. pers). Por lo tanto, para poder determinar el impacto de la reducción de los recursos del agraz por la presencia de colmenas de *A. mellifera* sobre las poblaciones de *Bombus* se hace necesario evaluar la importancia del recurso con relación a otros y al desarrollo de las colonias (medidas directas de éxito reproductivo). Estudios similares se han realizado con *Bombus* (*Bombus occidentalis*, *Bombus terrestris*) y otras abejas silvestres nativas (*Hylaeus alcyoneus*, Colletidae) y se ha encontrado que en la proximidad de colmenas hay una reducción significativa en el éxito reproductivo de las especies (menor cantidad de nidos en *H. alcyoneus*, menor producción de huevos en *B. occidentalis* y reinas de menor tamaño en *B. terrestris*) (Thomson 2004, Paini & Roberts 2005, Elbgami *et al.* 2014).

Después de *A. mellifera*, los machos de *Bombus* (*B. hortulanus*, *B. atratus*) fueron los más abundantes en la flores de *V. meridionale*. Específicamente en el sitio Moreno, se registró la mayor densidad de machos tanto de *B. hortulanus* como de *B. atratus*. Entre los polinizadores, los abejorros del género *Bombus* se consideran uno de los más importantes y eficientes en zonas de clima frío y templando. Esta afirmación se sustenta en estudios con hembras, principalmente con obreras, ya que estas son las que sostienen los nidos después de su iniciación por la reinas, pero con pocos estudios a prácticamente nulos, que analicen la importancia de los machos de *Bombus* en la polinización (Ostervik *et al.* 2010, Wolf & Moritz 2014). En general, la importancia de los machos de abejas en la polinización de plantas cultivadas o silvestres ha sido poco estudiado (Ne'eman *et al.* 2006, Wolf & Moritz 2014). En los estudios realizados se ha demostrado que los machos pueden ser polinizadores tan eficientes como las hembras, y a diferencia de las obreras que son forrajeadoras centrales (retornan a un nido), estos presentan características en su comportamiento que se consideran benéficas para el éxito reproductivo de los plantas, en particular en ecosistemas fragmentados. Los machos tienen mayores rangos de vuelo, permanecen menos tiempo en los parches y se mueven entre parches de forma más frecuente que las obreras, lo cual favorece el flujo de polen y el entrecruzamiento. En este estudio se obtuvieron pocos datos de visitas únicas de machos de *B. hortulanus*, sin embargo con estos se registraron valores similares a los obtenidos con obreras y reinas y con *A. mellifera*. Incluso, el mayor número de semillas se obtuvo con visitas únicas de machos. Según lo anteriormente expuesto, los machos de *Bombus* pueden estar realizando un aporte importante a la polinización de *V. meridionale*, en particular con el flujo de polen entre parches, lo cual es importante en su reproducción dado la clonalidad del agraz y las altas tasas de aborto de frutos cuando provienen de autopolinización (depresión por endogamia).

La deposición de polen fue mayor en sitios con altas densidades de abejas melíferas y polinizadores nativos, pero en estos la producción de frutos fue baja. Estos resultados pueden estar relacionados con diferentes factores: 1) altas tasas de geitonogamia asociado con altas densidades de visitantes florales que permanecen mucho tiempo en la misma planta, como algunas moscas y abejas de la familia Halictidae observados en los muestreos, 2) saturación del estigma con polen, lo que puede llevar a pérdida de receptividad, lo que se ha registrado para otras especies de *Vaccinium* (Parrie & Lang 1992) y, 3) grado de parentesco entre las plantas de la población. Si las poblaciones están formadas por individuos genéticamente similares las tasas de autogamia pueden ser mayores y en consecuencia se disminuye la producción debido a depresión de endogamia, lo cual se ha observado en el agraz (Capítulo 1) y 4) características de las plantas seleccionadas con respecto a su función en la población (fuente de semillas y/o de polen). *Vaccinium meridionale* se encuentra bajo proceso de separación sexual ya que se ha detectado que en las poblaciones hay plantas funcionalmente femeninas y plantas hermafroditas (ginodioecia). Se ha registrado que la presencia de plantas femeninas causa que las hermafroditas aumenten la producción de polen y disminuyan la producción de frutos para aumentar su contribución en la progenie (Ashman 2006). En otras palabras en las poblaciones ginodioicas es común encontrar plantas que actúan principalmente como fuente de polen y no como fuente de semillas. Esto se ha registrado para *Vaccinium angustifolium* y se considera importante para el manejo de los cultivos. En estos deben estar presentes tanto plantas femeninas como hermafroditas que sirvan como donadoras de polen (Myra *et al.* 2004).

La producción de frutos de racimos expuestos a polinizadores no difirió entre sitios con y sin colmenas pero si la producción de frutos de racimos embolsados. Estos resultados sugieren que la presencia de colmenas puede estar favoreciendo la polinización cruzada. *Vaccinium meridionale* asegura su reproducción por mecanismos asexuales o por autogamia, pero busca promover el entrecruzamiento facilitado por polinizadores (fuerte depresión por endogamia y mecanismos florales para aumentar la probabilidad de polinización por polinizadores como gran despliegue floral, larga longevidad floral y sesgo en la producción de néctar hacia la función femenina). En ese sentido, una mayor densidad de polinizadores podría favorecer la polinización cruzada y disminuir la tasa de autogamia (geitonogamia) dado que el néctar disponible disminuye rápidamente, lo que obligaría a los polinizadores a tener que moverse entre plantas y parches con mayor frecuencia en la búsqueda de recursos, y de estar forma aumentaría el flujo de polen (Mallick & Driessen 2009, Keasar *et al.* 2008). Sin embargo, es importante realizar estudios que

evalúen el impacto de la presencia de colmenas sobre la cantidad de néctar disponible y su efecto en la tasa de autogamia y entrecruzamiento. Por lo tanto, la densidad de polinizadores silvestres (principalmente *Bombus* spp. y abejas melíferas silvestres) es suficiente para asegurar una buena producción pero no para asegurar un entrecruzamiento. Estos resultados son importantes no solo para la reproducción de la especie sino que pueden tener relevancia en términos productivos ya que la especie parece haber desarrollado adaptaciones de historia de vida para maximizar el esfuerzo reproductivo en respuesta al origen del polen. La producción de frutos es baja (20-30%), como se encontró en este trabajo y en los ensayos de biología reproductiva, pero esta puede disminuir si hay mayores tasas de autogamia (Capítulo 1). Esto se ha registrado para otras especies que producen muchas flores pero pocos frutos, porque hay aborto selectivo de frutos (Stephenson 1981, Pflugshaupt *et al.* 2002).

2.5 Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que *A. mellifera* es un polinizador eficiente de *V. meridionale* y sugieren que la presencia de colmenas puede estar favoreciendo la retención de frutos por polinización cruzada. Esto es de gran relevancia para el manejo y conservación de la especie, ya que se encuentran en peligro de erosión genética por endogamia, debido a la fragmentación de los bosques y un proceso extractivo no sostenible derivado del incremento en la demanda de los frutos (Medina *et al.* 2009). Igualmente las densidades de abejas melíferas registradas en los sitios de estudio no parece afectar la abundancia de polinizadores nativos, pero si podría estar ocurriendo una fuerte competencia entre las especies ya que *A. mellifera* monopoliza los recursos ofrecidos por el agraz. Esto podría limitar el potencial de la apicultura en términos de un aumento en el número de colmenas, ya que con una mayor densidad de abejas, superiores a las registradas en este trabajo, si podrían verse afectadas las poblaciones de polinizadores nativos con relación a su éxito reproductivo por una reducción drástica o eliminación de un recurso que puede ser importante en su sostenimiento. En ese sentido es recomendable mantener una apicultura con bajas densidades de colmenas ya que es menos probable que tengan un impacto fuerte sobre los polinizadores nativos, y puede contribuir a través de la polinización, con el sostenimiento de otras formas de uso no maderable de los bosques andinos con roble, algunas con potencial económico (promisorias) como el agraz. Por lo tanto se hace necesario ampliar los estudios hacia otras especies presentes en los matorrales, como *Hesperomeles goudotiana*, *Rubus* spp., *Symplocos theiformis*, *V. stipularis*, *Viburnum* spp. y *Weinmannia tomentosa* visitadas frecuentemente por *A.*

mellifera y que son protectoras de quebradas, inductoras de matorrales y de bosques de roble (Aguilar 2009). Incluso, algunas de estas especies (*H. goudotiana*, *Rubus* spp, *V. stipularis*) también producen frutos aprovechados por las comunidades rurales con fines alimenticios o medicinales. Con esta información se podrá realizar una evaluación integral del potencial de la apicultura como alternativa de uso no maderable para los bosques andinos con roble en la Cordillera Oriental de Colombia.

Tabla 2-1. Sitios seleccionados (con y sin colmenas) para evaluar el efecto de presencia de colmenas de *Apis mellifera* sobre la producción de agraz *Vaccinium meridionale*.

Tratamiento	Con colmenas			Sin Colmenas		
Nombre del sitio	Jiménez	Bolívar	Sierra	Peña	González	Moreno
Departamento	Boyacá	Boyacá	Cundinamarca	Boyacá	Boyacá	Boyacá
Municipio	San Miguel de Sema	Chiquinquirá	Guachetá	Chiquinquirá	San Miguel de Sema	San Miguel de Sema
Vereda	Peña Blanca	Arboledas	Gachetá Alto	Sasa	El Charco	San Isidro
Latitud	5,554149	5,594305	5,4586	5,6287	5,5716	5,51730
Longitud	-73,7248	-73,7485	-73,6647	-73,7278	-73,7379	-73,6931
Altura (msnm)	2850	2727	2846	2786	2673	2732
Colmenas	2	4	4	0	0	0
Distancia (m)	100	25				
Cámara de cría	2	4	4			
Un alza	2	3				
Uso actual	Matorral agraz	Matorral agraz	Matorral agraz	Matorral agraz	Potrero agraz	Eucalipto agraz
Densidad agraz	180	120	220	150	110	300
# especies asociadas	37	32	34	30	29	18
Coberturas asociadas (%)	Bosque de roble (20), Pastizales (50), Matorrales (20), Cultivo (5), Plantación forestal (5)	Bosque de roble (20), Pastizal (50), Matorral (15), Cultivos (5), Plantación forestal (10)	Bosque de roble (60), Pastizal (20), Matorral (10), Cultivo (10)	Bosque de roble (10), Pastizal (30), Pastizal arbolado (30), Matorral (10), Cultivos (20)	Bosque de roble (20), Pastizales (70), Cultivo (5), Matorrales (5)	Bosque de roble (50), Pastizal (30), Pastizal arbolado (10), Matorral (5), Cultivos (5)
Manejo	NO	Poda, humus, plateo	NO	NO	NO	Poda, plateo
Pendiente (%)	10	35	22	42	15	40
Terreno circundante	Ondulado y montañoso	Ondulado	Montañoso	Ondulado	Ondulado	Ondulado y montañoso
Ubicación de las plantas seleccionadas	Pie de elevación	Ladera convexa	Ladera plana	Ladera plana	Meseta	Ladera plana

Tabla 2-2. Deposición de polen por *Apis mellifera* y *Bombus hortulanus* en una sola visita a *Vaccinium meridionale*. N=número de flores. Se presenta promedio \pm error estándar.

Tratamiento	N	# granos de polen	Mínimo	Máximo
<i>Apis mellifera</i>	42	121 \pm 11	16	278
<i>Bombus hortulanus</i>	31	94 \pm 16	0	305
Obreras	20	112 \pm 19	1	283
Machos	6	92 \pm 47	1	305
Reinas	5	30 \pm 15	0	69
Prueba <i>t</i>		1,38		
<i>P</i>		0,173		

Tabla 2-3. Formación (Inicial, Final) y aborto de frutos después de una sola visita de *Apis mellifera* y *Bombus hortulanus* a flores de *Vaccinium meridionale*. Se muestra promedio \pm error estándar.

Tratamiento	Replicas	Flores	Frutos (I)	Frutos (F)	Retención (I)	Retención (F)	Aborto
<i>Apis mellifera</i>	41	494	115	37	0,24 \pm 0,04	0,15 \pm 0,04	0,53 \pm 0,08
<i>Bombus hortulanus</i>	37	375	69	37	0,19 \pm 0,04	0,12 \pm 0,03	0,34 \pm 0,09
Machos	4	19	4	4	0,15 \pm 0,12	0,09 \pm 0,06	0,25 \pm 0,25
Obrera	23	244	41	23	0,15 \pm 0,04	0,08 \pm 0,03	0,49 \pm 0,14
Reinas	10	112	25	10	0,31 \pm 0,11	0,23 \pm 0,08	0,16 \pm 0,11
Prueba U de Mann-Whitney					702,5	664,5	175,5
<i>P</i>					0,563	0,816	0,074

Tabla 2-4. Características de los frutos de *Vaccinium meridionale* después de una sola visita de *Apis mellifera* y *Bombus hortulanus*. Se muestra promedio \pm error estándar.

Tratamiento	Peso (g)	Alto (mm)	Ancho (mm)	Semillas (#)
<i>Apis mellifera</i>	0,27 \pm 0,02	6,56 \pm 0,17	7,59 \pm 0,18	25 \pm 1
<i>Bombus hortulanus</i>	0,29 \pm 0,02	6,46 \pm 0,27	7,63 \pm 0,32	27 \pm 2
Machos	0,38 \pm 0,15	7,27 \pm 1,18	8,38 \pm 1,56	34 \pm 20
Obreras	0,27 \pm 0,01	6,64 \pm 0,12	7,75 \pm 0,15	22 \pm 2
Reinas	0,32 \pm 0,03	6,15 \pm 0,61	7,42 \pm 0,71	31 \pm 3
Prueba <i>t</i>	-0,16	0,88	0,57	-0,32
<i>P</i>	0,873	0,384	0,573	0,753

Tabla 2-5. Visitantes florales de *Vaccinium meridionale* con su abundancia (número total de insectos observados) en sitios con y sin colmenas. Con X se indican visitantes florales observados en las flores pero que no se registraron durante los conteos.

Visitante floral	Con colmenas (C)			Sin colmenas (S)			
	Bolívar	Jiménez	Sierra	González	Moreno	Peña	
<i>Apis mellifera</i>	288	325	302	278	182	156	1531
<i>Bombus hortulanus</i>	7	31	5	3	39	4	89
Obreras	1	7	X		3		11
Machos	6	12	4		36	X	58
Reinas		12	1	3		4	20
<i>Bombus atratus</i>	1	6	6	6	9		28
Obreras	1	4	6	4	X		15
Machos		2		X	9		11
Reinas				2			2
Otras abejas		8		31			39
<i>Bombus</i> sp.(♀)				X			0
<i>Thygater</i> sp. (♀)		3	X	X			3
Halictidae (♂♀)		5		31		X	36
Otros insectos	1	10	1	3	9		24
Diptera	1	2	1		9	X	13
Lepidoptera		2	X	3	X		5
Hymenoptera		6		X			6

Tabla 2-6. Densidad de *Apis mellifera* y de polinizadores nativos, deposición de polen y formación de frutos de *Vaccinium meridionale* en sitios con y sin colmenas. Se presenta promedio \pm error estándar. H=Prueba de Kruskal-Wallis.

Tratamiento/ Localidad	Abejas melíferas	Polinizadores nativos	Deposición de polen	Formación de frutos	
				Expuesto	Excluido
Con colmenas	9,5\pm0,5	0,8\pm0,2	42\pm1	23,0\pm0,7a	13,7\pm0,6b
Bolívar	9,0 \pm 0,9	0,3 \pm 0,1	45 \pm 3	22,4 \pm 1,2	15,3 \pm 1,2
Jiménez	10,2 \pm 0,8	1,7 \pm 0,4	57 \pm 3	12,5 \pm 1,0	11,8 \pm 1,0
Sierra	9,4 \pm 0,8	0,4 \pm 0,2	24 \pm 2	34,0 \pm 1,0	14,1 \pm 1,0
Sin colmenas	7,1\pm0,5	0,9\pm0,2	45\pm2	20,7\pm0,7a	17,1\pm0,7a
González	8,7 \pm 1,5	1,3 \pm 0,6	58 \pm 5	17,2 \pm 1,0	16,7 \pm 1,1
Moreno	5,7 \pm 0,6	1,8 \pm 0,3	44 \pm 3	22,0 \pm 1,3	16,7 \pm 1,3
Peña	4,9 \pm 0,4	0,1 \pm 0,1	33 \pm 3	22,8 \pm 1,1	17,9 \pm 1,1
	t=3,32 P =0,001	t=0,25 P =0,806	Z=-1,59 P =0,112	H=28,16 P =0,000	

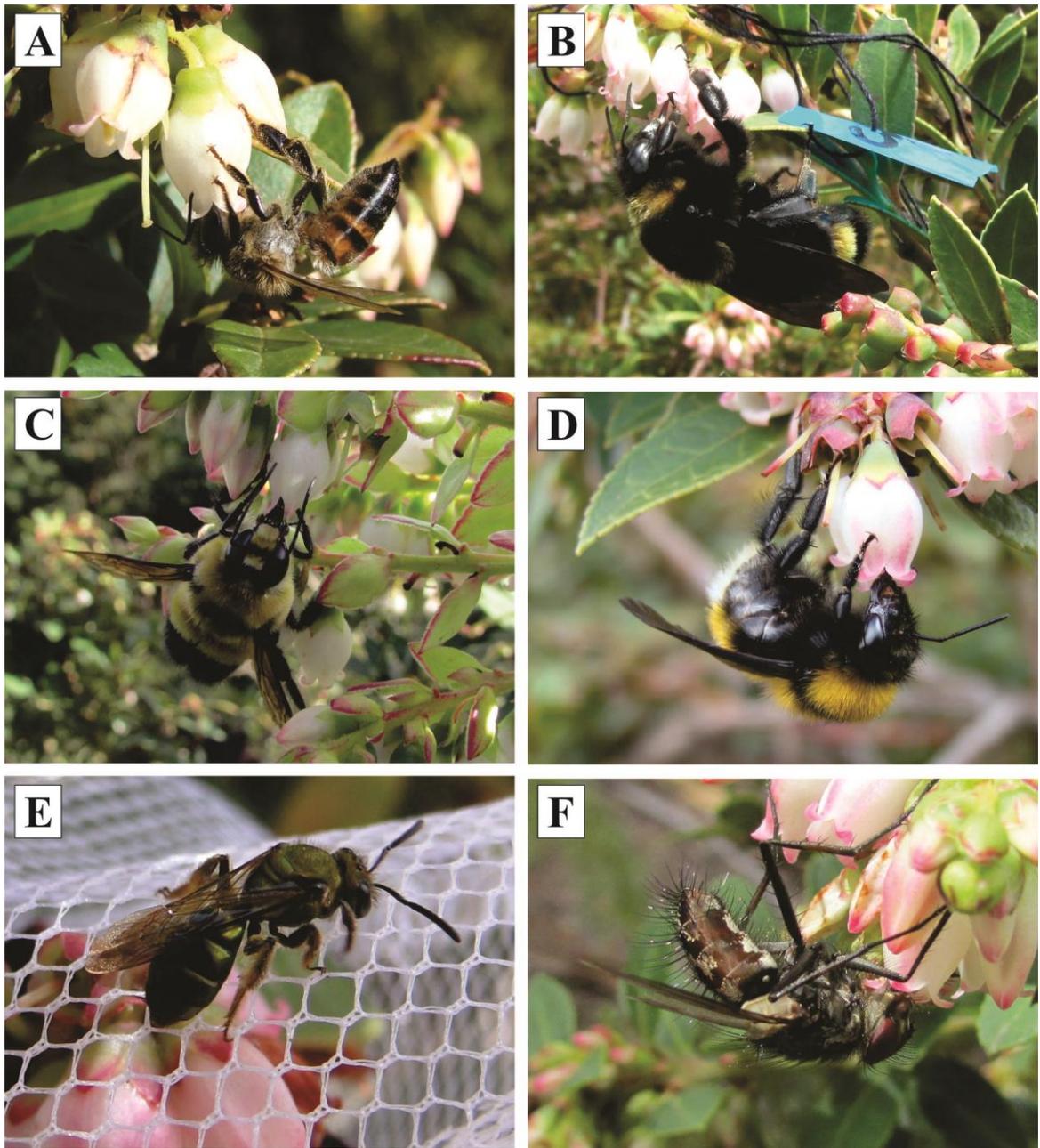


Figura 2-1. Figura 1. Polinizadores de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). A. *Apis mellifera*, B. *Bombus atratus* (Reina), C. *Bombus hortulanus* (macho), D. *Bombus hortulanus* (obrero), E. Halictidae, F. Diptera. Fotografías. Fermín J. Chamorro.

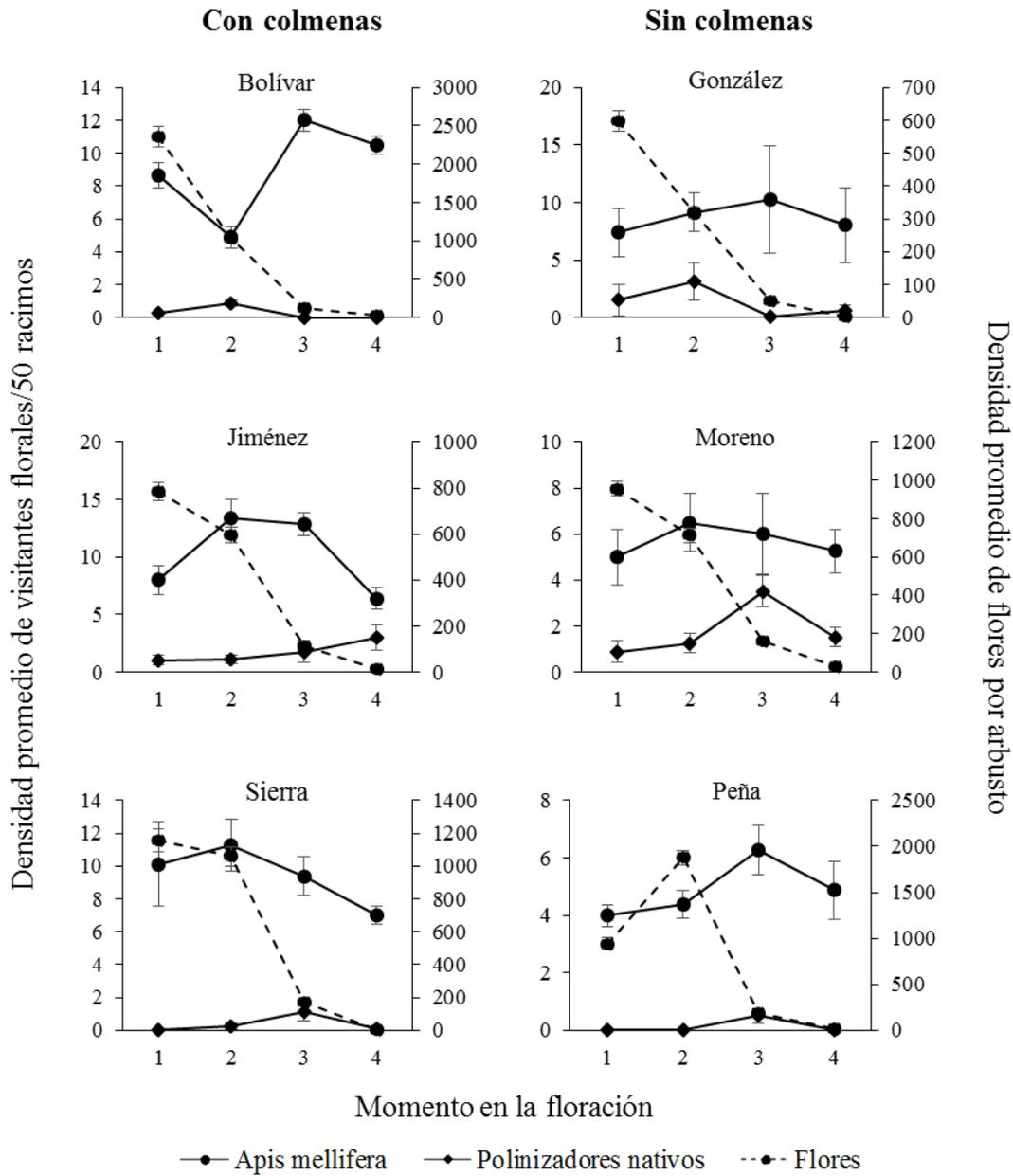


Figura 2-2. Densidad de abejas melíferas, polinizadores nativos y de flores en diferentes momentos de la floración de *Vaccinium meridionale* en sitios con y sin colmenas. Se presenta promedio \pm error estándar.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

***Vaccinium meridionale* produce frutos y semillas de forma asexual y por autopolinización pero la polinización cruzada es fundamental para su reproducción.**

Mediante experimentos de emasculación, exclusión de polinizadores y polinización manual se estudió el sistema reproductivo del agraz en dos poblaciones de la Cordillera Oriental de Colombia. Los resultados de estos experimentos mostraron que en las dos poblaciones estudiadas las plantas produjeron frutos por agamospermia, autogamia y xenogamia. No obstante, en las dos poblaciones se observó una fuerte depresión por endogamia manifestada en altas tasas de aborto de frutos producidos por autogamia. Estos resultados sugieren que la especie busca mantener el entrecruzamiento como principal estrategia para la producción de frutos y semillas, lo cual es coherente con los mecanismos florales desarrollados por la especie para atraer polinizadores, aumentar la probabilidad de polinización y evitar la interferencia de las funciones sexuales masculinas y femeninas de las flores: anteras poricidas que liberan polen sin vibración, oferta de néctar con sesgo a la función femenina, flores protándricas y con hercogamia, gran despliegue floral y larga longevidad floral. Además en las dos poblaciones estudiadas se registró la coexistencia de plantas femeninas y plantas hermafroditas (poblaciones ginodioicas), con lo que se refuerza que el entrecruzamiento es la estrategia reproductiva primaria de *V. meridionale* y la autogamia y agamospermia son mecanismos de aseguramiento reproductivo. La agamospermia hace parte de las estrategias de propagación clonal de la especie.

La polinización de *Vaccinium meridionale* no se limita a los insectos que hacen vibración, *Apis mellifera* es igual de eficiente que *Bombus hortulanus*.

Durante las observaciones de biología floral se encontró que a pesar de que *V. meridionale* presenta anteras poricidas la liberación de polen se da fácilmente sin vibración. Además las flores producen néctar como recompensa floral para sus polinizadores. Estas dos características facilitan

que se amplía el espectro de visitantes florales, que también pueden actuar como polinizadores. Esto se comprobó con los experimentos de visitas únicas y la comparación entre *A. mellifera* y *B. hortulanus*. *Apis mellifera* no hace polinización por vibración pero la cantidad de polen depositado en el estigma por esta abeja es similar a la depositada por *B. hortulanus* y con una sola visita de una abeja melífera hay formación de fruto. Igualmente se encontró que los machos de *B. hortulanus*, que tampoco hacen vibrar las anteras, son igual de eficientes que las obreras y que *A. mellifera*.

Una mayor densidad de abejas melíferas no aumentaría la producción de frutos de agraz pero si contribuiría a aumentar la retención de frutos por entrecruzamiento

La producción de frutos en sitios con colmenas no difirió de los sitios sin colmenas, sin embargo en los sitios con colmenas hubo una mayor retención de frutos en las flores expuestas a polinizadores comparada con las que se excluyeron de polinizadores. Estos resultados sugieren que hubo mayores niveles de polinización cruzada en los sitios con colmenas asociados a una alta densidad de polinizadores o ante una mayor densidad de polinizadores los recursos disponibles en las flores disminuyen rápidamente y en consecuencia los polinizadores visitan menos flores en una misma planta y más flores de plantas diferentes. Desde esta forma se disminuye la geitonogamia y aumenta la polinización cruzada. Los frutos de polinización cruzada son retenidos por *V. meridionale* en mayor proporción que los frutos de autopolinización.

3.2 Recomendaciones

Evaluar el efecto de la clonalidad del agraz sobre la tasa de autogamia facilitada por polinizadores, teniendo en cuenta el despliegue floral, la geitonogamia, la estructura espacial y variabilidad genética de las poblaciones (Albert *et al.* 2008).

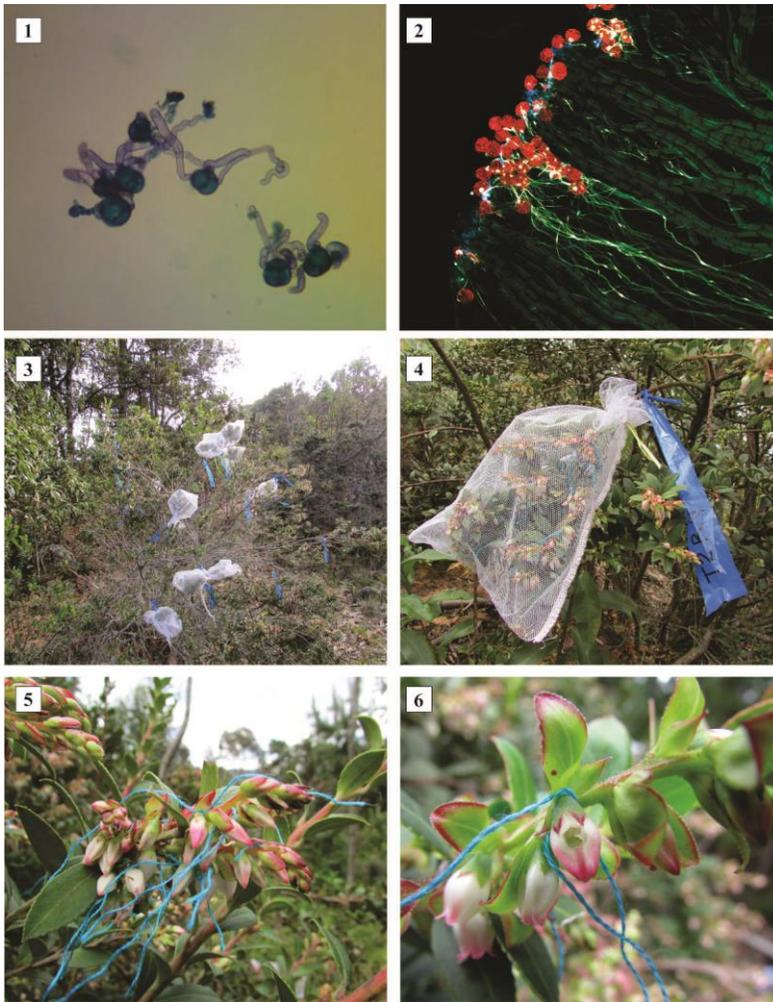
Estudiar la ginodioecia en *V. meridionale*, dado que este puede ser un factor clave para el futuro establecimiento del agraz como cultivo. La producción de frutos se puede aumentar con la propagación de plantas femeninas, pero también se requiere que haya plantas que sirvan como donadores de polen (Myra *et al.* 2004).

Evaluar la importancia de *Bombus atratus* como polinizador del agraz, dado que la experiencia existente en el país para su cría y manejo con fines de polinización de cultivos (Almanza 2007).

Evaluar la frecuencia de polinizaciones geitonógamas de *A. mellifera* en el agraz (Mitchell *et al.* 2004), con el fin de evaluar el potencial de la introducción de colmenas como complemento a la polinización natural

Evaluar el efecto de la polinización por abejas sobre otras características de calidad del fruto del agraz como azúcares y micronutrientes (Brittain *et al.* 2014).

A. Anexo: Metodología



A) Polen de agraz germinado en sacarosa (15%), B) Crecimiento de tubos polínicos en el ápice del estilo observado en epifluorescencia, C) Planta de agraz con diferentes tratamientos de polinización, D) Unidad floral para los experimentos de polinización, E) Botones marcados en un rama, F) Botón emasculado.

Bibliografía

- Adler LS, Irwin RE. 2006. Comparison of pollen transfer dynamics by multiple floral visitors: experiments with pollen and fluorescent dye. *Annals of Botany* 97 (1): 141–150.
- Aguilar M. 2009. Diagnóstico de estado del Vivero “El Robledal”, Reserva Forestal El Robledal, Vereda Gachetá Alto, Guachetá, Cundinamarca. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 63 p.
- Albert T, Raspé O, Jacquemart AL. 2008. Influence of clonal growth on selfing rate in *Vaccinium myrtillus* L. *Plant Biology* 10:5, 643-649.
- Almanza MT. 2007. Management of *Bombus atratus* bumblebees to pollinate Lulo (*Solanum quitoense* L), a native fruit from the Andes of Colombia. *Ecology and Development Series* no. 50. Göttingen: Cuvillier. 112 p.
- Anderson GJ, Bernardello G, Lopez P, Stuessy TF, Crawford DJ. 2000. Dioecy and wind pollination in *Pernettya* (Ericaceae) of the Juan Fernhdez Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 121-141.
- Arroyo MTK, Squeo FA. 1987. Experimental detection of anemophily in *Pernettya mucronata* (Ericaceae) in western Patagonia. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 108: 537-546.
- Ashman TL. 2004. Flower longevity. En: Nooden LD (ed). *Plant Cell Death Processes*. San Diego (CA-USA): Elsevier Academic Press. p 349-362.
- Ashman TL. 2006. The evolution of separate sexes: a focus on the ecological context. En: Harder LD, Barrett SCH (Eds). *Ecology and evolution of flowers*. Oxford: Oxford University Press. pp. 204–222.
- Barrett SCH. 2002. Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88: 154–159.
- Bell DJ, Drummond FA, Rowland LJ. 2012. Evidence of functional gender polymorphisms in a population of the hermaphroditic lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*). *Botany* 90: 393–399.
- Bernardello G, Aguilar R, Anderson GJ. 2004. The reproductive biology of *Sophora fernandeziana* (Leguminosae), a vulnerable endemic species from Isla Robinson Crusoe. *American Journal of Botany* 91(2): 198–206.

- Brevis, P.A. 2005. Factors controlling fruit set of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). PhD dissertation. University of Georgia. Athens, Georgia, USA. 112 p.
- Brittain C, Kremen C, Garber A, Klein AM. 2014. Pollination and Plant Resources Change the Nutritional Quality of Almonds for Human Health. PLoS ONE 9(2): e90082. doi:10.1371/journal.pone.0090082
- Brown JC. 2001. Responding to deforestation: productive conservation, the World Bank, and beekeeping in Rondonia, Brazil. The Professional Geographer 53 (1): 16-119.
- Buchmann SL. 1983. Buzz pollination in angiosperms. p. 73-113. En: Jones CE, Little RJ (eds). Handbook of Experimental Pollination Biology. New York: Van Nostrand Reinhold Co. 558 p.
- Butz VM. 1997. Ecological Impacts of Introduced Honey Bees. The Quarterly Review of Biology 72 (3): 275-29.
- Cane JH, Eickwort GC, Wesley FR, Spielholz J. 1985. Pollination Ecology of *Vaccinium stamineum* (Ericaceae: Vaccinioideae). American Journal of Botany 72 (1). 135-142.
- Caraballo-Ortiz MA, Santiago-Valentín E. 2011. The breeding system and effectiveness of introduced and native pollinators of the endangered tropical tree *Goetzea elegans* (Solanaceae). Journal of Pollination Ecology 4(4):26-33.
- Carlson JE, Harms KE. 2006. The Evolution of Gender-Biased Nectar Production in Hermaphroditic Plants. The Botanical Review 72(2): 179–205.
- Castrillón JC, Carvajal E, Ligarreto G, Magnitskiy S. 2008. El efecto de auxinas sobre el enraizamiento de las estacas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) en diferentes sustratos. Agronomía Colombiana 26(1): 16-22.
- Castro C, Olarte Y, Rache L, Pacheco J. 2012. Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). Agronomía Colombiana 30 (2): 196-203.
- Cayuela L, Ruiz-Arriaga S, Ozers CP. 2011. Honeybees Increase Fruit Set in Native Plant Species Important for Wildlife Conservation. Environmental Management 48 (5): 910-919.
- Celebrezze T, Paton DC. 2004. Do introduced honeybees (*Apis mellifera*, Hymenoptera) provide full pollination service to bird adapted Australian plants with small flowers? An experimental study of *Brachyloma ericoides* (Epacridaceae). Austral Ecology 29 (2): 129–136.
- Chacoff NP, García D, Obeso JR. 2008. Effects of pollen quality and quantity on pollen limitation of *Crataegus monogyna* (Rosaceae) in the NW of Spain. Flora 203: 499-507.
- Chamorro FJ, Bonilla D, Nates-Parra G. 2013a. El polen apícola como producto forestal no maderable en la Cordillera oriental de Colombia. Colombia Forestal 16(1): 53 – 66.

- Chamorro FJ, Nates-Parra G, Kondo T. 2013b. Mielato de *Stigmatococcus asper* (Hemiptera: Stigmatococcidae): recurso melífero de bosques de roble en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 61-70.
- Charlesworth D, Charlesworth B. 1987. Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* (18): 237-268.
- Charlesworth, B, Charlesworth D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* 112 (988): 975–997.
- Cruden RW. 1977. Pollen-Ovule Ratios: A Conservative Indicator of Breeding Systems in Flowering Plants. *Evolution* 31 (1): 32-46.
- Dafni A, Pacini E, Nepi M. 2005. Pollen and stigma biology. En: Dafni A, Kevan PG, Husband BC (Eds.). *Practical pollination ecology*. Cambridge (Ontario, Canada): Enviroquest Ltd. p. 83-145.
- Dalling JW. 1994. Vegetation Colonization of Landslides in the Blue Mountains, Jamaica. *Biotropica* 26 (4): 392-399.
- De Luca PA, Vallejo-Marín M. 2013. What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 429–435.
- Delph LF, Lively CM, Webb CJ. 2006. Gynodioecy in native New Zealand *Gaultheria* (Ericaceae). *New Zealand Journal of Botany* 44 (4): 415-420.
- Dick CW, Etchelecu G, Austerlitz F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dizinia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology* 12:753–764.
- Dogterom MH. 1999. Pollination by four species of bees on highbush blueberry [Ph.D. dissertation]. Burnaby (British Columbia, Canada): Simon Fraser University.
- Eilers EJ, Kremen C, Greenleaf SS, Garber AK, Klein AM. 2011. Contribution of Pollinator-Mediated Crops to Nutrients in the Human Food Supply. *PLoS ONE* 6 (6): e21363. doi:10.1371/journal.pone.0021363.
- Elbgami T, Kunin WE, Hughes WH, Biesmeijer J. 2014. The effect of proximity to a honeybee apiary on bumblebee colony fitness, development, and performance. *Apidologie* 45 (4): 504-513.
- Freitas BM, Pereira JOP. (eds). 2004. Solitary bees. Conservation, rearing and management for pollination. Universidade Federal do Ceará, Imprensa Universitária. Fortaleza, Ceará, Brasil. 285p.

- Galetto L, Bernardello G. 2005. Rewards in flowers: Nectar. En: Dafni A, Kevan PG, Husband BC (Eds.). Practical pollination ecology. Cambridge (Ontario, Canada): Enviroquest Ltd. p. 261-313.
- Garzón GA, Narváez CE, Riedl KM, Schwartz SJ. 2010. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. Food Chemistry 122: 980–986.
- Goulson D. 2003. Effects of introduced bees on native ecosystems. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 34:1–26.
- Gross CL, Mackay D. 1998. Honeybees reduce fitness in the pioneer shrub *Melastoma affine* (Melastomataceae). Biological Conservation 86 (2):169–178.
- Gross CL. 2001. The effect of introduced honeybees on native bee visitation and fruit-set in *Dillwynia juniperina* (Fabaceae) in a fragmented ecosystem. Biological Conservation 102 (1):89–95.
- Guillaume P, Jacquemart AL. 1999: Early-inbreeding depression in *Vaccinium myrtillus* and *V. vitis-idaea*. Protoplasma 208: 107–114.
- Guitian J. 1993. Why *Prunus mahaleb* (Rosaceae) Produces More Flowers than Fruits. American Journal of Botany 80 (11): 1305-1309.
- Guitian J. 1994. Selective Fruit Abortion in *Prunus mahaleb* (Rosaceae). American Journal of Botany 81 (12): 1555-1558.
- Gupton CL, Spiers JM. 1994. Interspecific and Intraspecific Pollination Effects in Rabbiteye and Southern Highbush Blueberry. HortScience 29(4): 324-326.
- Hagerup O. 1954. Autogamy in some drooping *Bicornes* flowers. Botanisk Tidsskrift 51: 103-116.
- Hansen DM, Olesen JM, Jones CG. 2002. Trees, birds, and bees in Mauritius: exploitative competition between introduced honey bees and endemic nectarivorous birds? Journal of Biogeography 29:721–734.
- Harder, L.D. & Barrett, S.C.H. (1995) Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. Nature 373 (9): 512–515.
- Heinrich B. 1975. Energetics of Pollination. Annual Review of Ecology and Systematics 6: 139-170.
- Hernández MI, Lobo M, Medina CI, Cartagena JR, Delgado OA. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). Agronomía Colombiana 27: 15-23.

- Hokanson K, Hancock J. 2000. Early-acting inbreeding depression in three species of *Vaccinium* (Ericaceae). *Sexual Plant Reproduction* 13: 145–150.
- Jacobs FJ, Simoens C, De Graaf DC, Deckers J. 2006. Scope for non-wood forest products income generation from rehabilitation areas: focus on beekeeping. *Journal of the Drylands* 1(2): 171-185.
- Jacquemart AL, Thompson JD. 1996. Floral and pollination biology of three sympatric *Vaccinium* (Ericaceae) species in the Upper Ardenne, Belgium. *Canadian Journal of Botany* 74: 210-221.
- Jacquemart AL. 2003. Floral traits of belgian ericaceae species: are they good indicators to assess the breeding systems?. *Belgian Journal of Botany* 136 (2): 154-164.
- Javorek SK, Mackenzie KE, Vander Kloet SP. 2002. Comparative pollination effectiveness among bees (Hymenoptera:Apoidea) on lowbush blueberry (Ericaceae: *Vaccinium angustifolium*). *Annals of the Entomological Society of America* 95 (3): 345-351.
- Keasar T, Sadeh A, Shmida A. 2008. Variability in nectar production and standing crop, and their relation to pollinator visits in a Mediterranean shrub. *Arthropod-Plant Interactions* 2:117–123
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of Royal Society B* 274: 303–313.
- Klinkhamer PGL, De Jong TJ, Metz JAJ. 1994. Why Plants can be too Attractive - A Discussion of Measures to Estimate Male Fitness. *Journal of Ecology* 82 (1): 191-194.
- Krebs SL, Hancock JF. 1990. Early acting inbreeding depression and reproductive success in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 79 (6): 825–832.
- Krebs SL, Hancock JF. 1991. Embryonic genetic load in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 78 (10): 1427–1437.
- Kudo G, Kawai Y, Hirao AS. 2011. Pollination efficiency of bumblebee queens and workers in the alpine shrub *Rhododendron aureum*. *International Journal of Plant Sciences* 172 (1):70-77.
- Lande R, Schemske DW. 1985. The evolution of self fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic Models. *Evolution* 39 (1): 24–40.
- Lang GA, Danka RG. 1991. Honey-bee-mediated Cross- versus Self-pollination of ‘Sharpblue’ Blueberry Increases Fruit Size and Hastens Ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116 (5):770-773.

- Larson BMH, Barrett SCH. 1999. The pollination ecology of buzz-pollinated *Rhexia virginica* (Melastomataceae). *American Journal of Botany* 86(4): 502–511.
- Larson BMH, Barrett SCH. 2000. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 503–520.
- Ligarreto GA, Torres-Aponte WS, Ariza-Castillo CA. 2013. Propagation of the neotropical fruit *Vaccinium meridionale* Swartz by air layering. *Agronomía Colombiana* 31(2): 169-175.
- Ligarreto GA. (Ed). 2009. Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño. (*Vaccinium meridionale* Swartz) en la zona altoandina de Colombia. Bogotá: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia y COLCIENCIAS. 134 p.
- Ligarreto GE, Patiño MP, Magnitskiy S. 2011. Phenotypic plasticity of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) in wild populations of mountain forests in Colombia. *Revista de Biología Tropical* 59 (2): 569-583.
- Lloyd DG, Schoen DJ. 1992. Self- and Cross-Fertilization in Plants. I. Functional Dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153 (3-Part 1): 358-369.
- Luteyn J. 1989. Speciation and diversity of Ericaceae in neotropical montane vegetation. En: Holm-Nielsen LB, Nielsen IC, Balslev H (eds.). *Tropical forests: Botanical dynamics, speciation and diversity*. London: Academic Press. P. 297-310.
- Luteyn, J. 2002. Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: Biogeographical patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review* 68 (1): 55-87.
- MacKenzie K. 2009. Pollination Practices and the Use of Bees in *Vaccinium* Crops. *Acta Horticulturae* 810: 527–538.
- MacKenzie K. 1997. Pollination requirements of three varieties of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122 (6):891-896.
- Magnitskiy S, Ligarreto G. 2007. El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético en la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 1 (2): 137-141.
- Mahy G, De Sloover J, Jacquemart AL. 1998. The generalist pollination system and reproductive success of *Calluna vulgaris* in the Upper Ardenne. *Canadian Journal of Botany* 76: 1843–1851.
- Mahy G, Jacquemart AL. 1999. Early inbreeding depression and pollen competition in *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Annals of Botany* 83 (6): 697–704.
- Mallick SM, Driessen MM. 2009. Impacts of hive honeybees on Tasmanian leatherwood *Eucryphia lucida* Labill. (Eucryphiaceae). *Austral Ecology* 34: 185-195.

- Mandujano-Sánchez MC. 2007. La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En: Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. (Comp.). *Ecología Molecular*. México, D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. p. 215–250.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. *Stain Technology* 34:125-128.
- Medina CI, Lobo M, Patiño M, Ligarreto GA, Delgado OA, Lopera SA, Toro JL. 2009. Variabilidad morfológica del agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) en zonas altoandinas de Colombia En: Ligarreto GA (Ed). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño. (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina de Colombia*. Bogotá, D.C: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá e Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología-COLCIENCIAS.134 p.
- Medrano M, Herrera CM, Barrett SCH. 2005. Herkogamy and Mating Patterns in the Self-compatible Daffodil *Narcissus longispathus*. *Annals of Botany* 95: 1105–1111.
- Middleton DJ. 1991. Ecology, reproductive biology and hybridization in *Gaultheria* L. *Edinburgh Journal of Botany* 48: 81-89.
- Ministerio del Medio Ambiente, Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). 2007. Estrategia de transferencia de tecnología ambiental sobre especies promisorias de la fauna y flora silvestres. En: <http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/ciencias/sena/cursos-de-capacitacion/estrategia/indice.htm> (Fecha de consulta: Mayo de 2012).
- Mitchell RJ, Karron JD, Holmquist KG, Bell JM. 2004. The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology* 18: 116-124.
- Morandin LA, Winston ML. 2006. Pollinators provide economic incentive to preserve natural land in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment* 116 (3-4): 289–292.
- Moritz RFA, Härtel S, Neumann P. 2005. Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Ecoscience* 12: 289–301.
- Muñoz JD, Martínez LJ, Ligarreto GA. 2009. 2009. Caracterización de los ambientes agroecológicos del agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz) en la zona altoandina de Colombia. En: Ligarreto GA (Ed). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño. (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina de Colombia*. Bogotá, D.C: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá e Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología-COLCIENCIAS.134 p.

- Myra M, MacKenzie K, Vander Kloet SP. 2004. Investigation of a possible sexual function specialization in the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait. Ericaceae). *Small Fruits Review* 3(3–4): 313–324.
- Nates-Parra G, González VH. 2000. Las abejas silvestres de Colombia: por qué y cómo conservarlas. *Acta Biológica Colombiana* 5 (1): 5-37.
- Ne'eman G, Shavit O, Shaltiel L, Shmida A. 2006. Foraging by male and female solitary bees with implications for pollination. *Journal of Insect Behavior* 19: 383-401.
- Nepi M, Stpiczyńska M. 2008. The complexity of nectar: secretion and resorption dynamically regulate nectar features. *Naturwissenschaften* 95:177–184.
- Nestby R, Percival D, Martinussen I, Opstad N, Rohloff, J. 2011. The European blueberry (*Vaccinium myrtillus*) and the potential for cultivation. A review. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 5 (Special Issue I): 5-16.
- Neves EL, Viana BF. 2011. Pollination efficiency of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) on the monoecious plants *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. and *Jatropha mutabilis* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) in a semi-arid Caatinga area, northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 71(1): 107-113.
- Nuortila C, Tuomi J, Aspi J, Laine K. 2006. Early-acting inbreeding depression in a clonal dwarf shrub, *Vaccinium myrtillus*, in a northern boreal forest. *Annales Botanici Fennici* 43: 36–48.
- Ostervik KL, Manson JS, Thomson JD. 2010. Pollination potential of male bumblebees (*Bombus impatiens*): Movement patterns and pollen transfer efficiency. *Journal of Pollination Ecology* 2(4): 21–26.
- Paini DR, Roberts JD. 2005. Commercial honey bees (*Apis mellifera*) reduce the fecundity of an Australian native bee (*Hylaeus alcyoneus*), *Biological Conservation* 123: 103–112.
- Paini DR. 2004. Impact of the introduced honey bee (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae) on native bees: A review. *Austral Ecology* 29: 399–407.
- Parrie EJ, Lang GA. 1992. Self- and cross-pollination affect stigmatic pollen saturation in blueberry. *HortScience* 27: 1105–1107.
- Pedraza-Peñalosa P, Luteyn JL. 2011. Andean *Vaccinium* (Ericaceae: Vaccinieae): Seven new species from South America. *Brittonia*, 63(2): 257–275.
- Pflugshaupt K, Kollmann J, Fischer M, Roy B. 2002. Pollen quantity and quality affect fruit abortion in small populations of a rare fleshy-fruited shrub. *Basic and Applied Ecology* 3: 319–327.

- Pinilla MS. 2013. Visitantes florales y polinizadores potenciales del agraz (*Vaccinium meridionale*) en Cundinamarca y Boyacá [Tesis de pregrado]. Bogotá: Departamento de biología, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada.
- Primack RB. 1985. Longevity of individual flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 15–37.
- Pyke GH. 1991. What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* 350: 58–59.
- Rache L, Pacheco JC. 2010. Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta Botanica Brasilica* 24 (4): 1086-1095.
- Ramírez N. 2005. Plant sexual systems, dichogamy, and herkogamy in the Venezuelan Central Plain. *Flora* 200: 30–48.
- Raspé O, Guillaume P, Jacquemart AL. 2004. Inbreeding depression and biased paternity after mixed-pollination in *Vaccinium myrtillus* L. (Ericaceae). *International Journal of Plant Sciences* 165 (5): 765–771.
- Rathcke BJ. 2003. Floral longevity and reproductive assurance: seasonal patterns and an experimental test with *Kalmia latifolia* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 90(9): 1328–1332.
- Rathcke B, Real L. 1993: Autogamy and inbreeding depression in Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* (Ericaceae). — *Am. J. Bot.* 80: 143–146.
- Richards AJ. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of Royal Society B Biological Sciences* 358 (1434): 1085–1093.
- Rodríguez N, Rincón A, Armenteras D, Mendoza H, Umaña AM, Arango N, Baptiste MP. 2005. Corredor nororiental de robles: indicadores de estado de la biodiversidad, factores antrópicos asociados y áreas prioritarias de conservación. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Serie: Indicadores de Seguimiento y Evaluación de la Política de Biodiversidad. 88 p.
- Roubik D. 2009. Ecological impact on native bees by the invasive Africanized honey bee. *Acta Biológica Colombiana* 2: 115 – 124.
- Salinas N, Cárdenas D. 2007. Roble: *Quercus humboldtii*. En: Cárdenas D, Salinas N (Eds.). Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 4. Especies maderables amenazadas: Primera parte. Serie de libros rojos de especies amenazadas en Colombia. Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI), Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. p. 23-29.
- Sampson BJ, Cane JH. 2000. Pollination efficiencies of three bee (Hymenoptera: Apoidea) species visiting rabbiteye blueberry. *Journal of Economic Entomology* 93: 1726-1731.

- Seavey SR, Bawa KS. 1986. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review* 52 (2): 195–219.
- Siegel S, Castellan NJ. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences* (2nd ed.) New York: McGraw-Hill. 399 p.
- Statsoft Inc. 2011. *Statistica* (data analysis software system), version 10 for Windows. Tulsa, Oklahoma: Statsoft. www.statsoft.com.
- Steinacher G, Wagner J. 2010. Flower longevity and duration of pistil receptivity in high mountain plants. *Flora* 205: 376–387
- Stephens DT, Levesque DE, Davis AR. 2012. Pollen-ovule ratios in seven species of *Vaccinium* (Ericaceae) and stamen structure in *Vaccinium myrtilloides* and *Vaccinium vitis-idaea*. *Botany* 90: 599–614.
- Stephenson AG. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate function. *Annual review of ecology and systematics* 12: 253–281.
- Tanner EVJ. 1982. Species diversity and reproductive mechanisms in Jamaican trees. *Biological Journal of the Linnean Society* 18 (3): 263-278.
- Thomson D. 2004. Competitive interactions between the invasive European honey bee and native bumble bees. *Ecology* 85 (2): 458–470.
- Torres WE, Montoya IA, Ligarreto GE. 2009. Aspectos sociales y económicos de la producción de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). En: Ligarreto GA. (Ed). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño. (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina de Colombia*. Bogotá, D.C.: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá e Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología-COLCIENCIAS. 134 p.
- Torres-Díaz C, Gómez-González S, Stotz GC, Torres-Morales P, Paredes B, Pérez-Millaqueo M, Gianoli E. 2011. Extremely Long-Lived Stigmas Allow Extended Cross-Pollination Opportunities in a High Andean Plant. *PlosONE* 6(5): e19497. doi:10.1371/journal.pone.0019497.
- Usui M, Kevan PG, Obbard M. 2005. Pollination and Breeding System of Lowbush Blueberries, *Vaccinium angustifolium* Ait. and *V. myrtilloides* Michx. (Ericaceae), in the Boreal Forest. *The Canadian Field-Naturalist* 119 (1): 48-57.
- Vaissière B, Freitas B, Gemil-Herren B. 2011. *Protocol to detect and assess pollination deficits in crops*. Rome: Italy Food and Agriculture organization of the United Nations-FAO. 70 p.
- Valencia, M.L.C. de; Ramírez, F. 1993. Notas sobre la morfología, anatomía y germinación del Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz.). *Agronomía Colombiana* 10: 151-159.

-
- Vaughton G, Ramsey M. 2011. Reproductive allocation and costs in gynodioecious *Leucopogon melaleuroides* (Ericaceae): implications for the evolution of gender dimorphism. *Plant Biology* 13: 888-895.
- Wolf S, Moritz RFA. 2014. The pollination potential of free-foraging bumblebee (*Bombus* spp.) males (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 45(4): 440-450.