



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



iibce

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar al Título de Licenciada en Bioquímica

Rol de la suplementación proteica en el estado sanitario y fortaleza de colonias de abejas *Apis mellifera* sometidas a estrés nutricional.

DANIELA NATALI JORGE PÉREZ

Tutora: Dra. Karina Antúnez

Co-tutora: Mag. Belén Branchiccela

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2018

MONTEVIDEO, URUGUAY

Tabla de contenido

Resumen.....	4
1. Introducción	5
1.1 Importancia de la abeja <i>Apis mellifera</i>	6
1.2 Despoblación de colmenas.....	6
1.3 Nutrición de las abejas	7
1.4 Patógenos de la abeja <i>A. mellifera</i>	8
1.4.1 Virus ARN.....	8
1.4.1.1 Virus de las alas deformadas (DWV).....	9
1.4.1.2 Virus de la parálisis aguda (ABPV)	10
1.4.1.3 Técnicas para la detección de virus	10
1.4.2 Varroa destructor	12
1.4.3 Microsporidio <i>Nosema spp</i>	13
1.4.3.1 Generalidades	13
1.4.3.2 Ciclo infeccioso de <i>Nosema spp</i> en la abeja <i>Apis mellifera</i>	13
1.4.3.3 <i>Nosema apis</i> , <i>Nosema ceranae</i> y <i>Nosema neumanii</i>	15
1.4.3.4 Nosemosis	16
1.4.3.5 Control de <i>Nosema spp</i>	17
1.4.3.6 Técnicas de detección de <i>Nosema spp</i>	18
1.5 La apicultura en Uruguay	18
2. Hipótesis y objetivos	21
2.1 Hipótesis.....	22
2.2 Objetivo general.....	22
2.3 Objetivos específicos.....	22
3. Materiales y métodos	23
3.1 Preparación de la torta de polen polifloral	24
3.2 Instalación del apiario experimental.....	24
3.3 Diseño experimental	24
3.4 Estimación de la fortaleza de las colmenas.....	25
3.5 Análisis del nivel de infección con virus	26
3.6 Análisis del nivel de infección con <i>Nosema spp</i>	28
3.7 Determinación de la especie de <i>Nosema spp</i>	28
3.8 Análisis de resultados.....	30
4. Resultados	31

4.1 Población de abejas adultas	32
4.2 Nivel de infección con virus.....	33
4.2.1 ABPV	34
4.2.2 DWV.....	35
4.3 Nivel de infección con Nosema spp	36
4.4 Determinación de la especie de Nosema spp.	37
4.5 Asociación entre los niveles de infección con patógenos y la población de abejas adultas	38
5. Discusión	39
6. Conclusiones y Perspectivas.....	43
6.1 Conclusiones.....	44
6.2 Perspectivas	45
7. Bibliografía	46

Resumen

La pérdida masiva de colonias de abejas *Apis mellifera* reportadas alrededor del mundo constituye un tema de preocupación mundial. Motiva dicha preocupación el rol fundamental que cumplen estos organismos a nivel ecosistémico debido a que constituyen los principales organismos polinizadores, permitiendo la reproducción de las plantas. Factores como la infección por distintos patógenos, la desnutrición y la exposición a pesticidas podrían estar involucrados.

Este estudio se realizó con el objetivo de analizar el impacto de la suplementación con polen polifloral en la fortaleza y salud de colmenas sometidas a estrés nutricional ubicadas en una plantación de *Eucalyptus grandis*. Para eso se analizó el efecto de dicha suplementación en la población de abejas adultas, y en los niveles de infección con los virus ABPV y DWV, y el microsporidio *Nosema spp.* A su vez se determinó la relación entre la infección con estos patógenos y la población de abejas adultas.

La suplementación con polen polifloral en colmenas sometidas a estrés nutricional disminuyó los niveles de infección con *Nosema spp.* y generó un aumento en la población de abejas. Esto indica que la estrategia propuesta podría ser de utilidad para mejorar la fortaleza de la colmena así como mejorar su salud.

Por otra parte, las colmenas suplementadas tuvieron mayores niveles de infección con los virus ABPV y DWV, pero estos mayores niveles de infección no se reflejaron en un mayor daño a la colmena. Esto sugiere que en estas condiciones estos virus no serían un problema para la salud de la colmena.



1.1 Importancia de la abeja *Apis mellifera*

Las abejas (familia Apoidea) cumplen un rol fundamental en el ecosistema ya que son consideradas como los organismos polinizadores predominantes a nivel mundial (Mc Gregorc, 1976). La polinización consiste en la transferencia del polen desde los órganos florales masculinos (estambre) a los órganos florales femeninos (pistilo), permitiendo la reproducción de una gran variedad de plantas (Mc Gregorc, 1976).

Se ha reportado que la mayoría de los cultivos necesarios para la alimentación mundial dependen en algún grado de la polinización entomófila o se ve favorecida por la misma (Klein *et al.*, 2007; Abrol, 2012). Esto se debe a que aumenta la producción de un gran número de cultivos y/o mejora la calidad de los mismos (Klein *et al.*, 2007). Se estima que la contribución de la polinización a la producción de alimentos es de 153 billones de euros que corresponde al 9,5% de la producción alimenticia total (Gallai *et al.*, 2009). Además de su importancia en la producción, su función es crucial para el mantenimiento de los hábitats naturales y contribuye a conservar la biodiversidad de los mismos (Morse y Calderone, 2000)

Dentro de la familia Apoidea, la abeja *Apis mellifera* (*A. mellifera*) es la especie mas común de las 20.000 que se conocen en todo el mundo (Unep, 2011), y es la principal especie polinizadora (Morse y Calderone, 2000). Además, estas abejas también generan diferentes productos como miel, polen, cera, propóleos y jalea real, entre otros (Crane y Graham, 2015) .

1.2 Despoblación de colmenas

En los últimos años han habido reportes de pérdidas masivas de colmenas de abejas *A. mellifera* en diferentes países alrededor del mundo (Ellis *et al.*, 2010; Neumann y Carreck, 2010) ocasionando pérdidas de hasta un 35 % en Estados Unidos (VanEngelsdorp *et al.*, 2008; 2009).

Se ha planteado que las pérdidas masivas de colmenas sería un fenómeno multicausal (vanEngelsdorp y Meixner, 2010), involucrando diversos factores como la desnutrición de las abejas, la infección con distintos patógenos, la intoxicación con pesticidas, el cambio climático y el manejo inapropiado de las colmenas (Morse y Flottum, 1997; Cox-Foster *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2007, 2008; vanEngelsdorp y Meixner, 2010; Genersch, 2010).

La gran incidencia de este fenómeno a nivel mundial lo convierte en una gran amenaza tanto para el mantenimiento de los ecosistemas naturales, la producción de alimentos y la industria apícola (Gallai *et al.*, 2009).

1.3 Nutrición de las abejas

La alimentación de la abeja se basa en el consumo de miel y polen. La miel es la principal fuente de energía mientras que el polen de proteínas (Brosdschneider y Crailsheim, 2010). Este último, suministra todos los aminoácidos esenciales (arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina), además de vitaminas, lípidos y micronutrientes (de Groot, 1953). También contiene compuestos antioxidantes y antimicrobianos (Morais *et al.*, 2011; Pascoal *et al.*, 2014) los cuales tendrían el potencial de mejorar la salud de las colmenas.

La calidad del polen consumido por las abejas *A. mellifera* influye en su estado fisiológico (Ament *et al.*, 2008; Alaux *et al.*, 2010; 2011; Di Pasquale *et al.*, 2013), longevidad (Di Pasquale *et al.*, 2013), sensibilidad a pesticidas (Wahl y Ulm, 1983; Schmehl *et al.*, 2014) y en su productividad (Brosdschneider y Crailsheim, 2010). A la vez, se ha propuesto que influye en el sistema inmune de la abeja (Alaux *et al.*, 2010) y en su capacidad de protegerse frente a la infección con potenciales patógenos como bacterias (Rinderer *et al.*, 1974), virus (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010) y microsporidios (Porrini, 2011; Huang, 2012).

En los últimos años la intensificación en el uso del suelo ha llevado a un aumento en las superficies destinadas a plantaciones de monocultivo. Esto determina que las abejas tengan a su disponibilidad una única fuente de polen

por cortos períodos de tiempo (época de floración del cultivo) (Naug, 2009) y que en muchos casos no provee todos los requerimientos nutricionales que las abejas necesitan (Donkersley *et al.*, 2014). En este sentido puede generar problemas nutricionales y estar asociado a la despoblación de colmenas.

1.4 Patógenos de la abeja *A. mellifera*

Debido a su forma de vida en sociedad, las abejas constituyen un blanco sumamente interesante para muchos patógenos, destacándose la infección con microsporidios, ácaros, virus y bacterias, entre otros. La infección con plagas y patógenos ha sido reportada como otra posible causa asociada a las pérdidas masivas de colmenas (Chen y Siede, 2007; Higes *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2009; vanEngelsdorp y Meixner, 2010; Dainat *et al.*, 2012).

1.4.1 Virus ARN

Se han identificado 18 virus que infectan abejas *A. mellifera*, siendo todos estos virus de tipo ARN (Allen y Ball, 1996; Ellis y Munn, 2005).

En la actualidad siete virus son considerados de relevancia sanitaria para la apicultura: el virus de la Parálisis aguda (ABPV), el virus de las Celdas reales negras (BQCV), el virus de la Parálisis crónica (CBPV), el virus de las Alas deformadas (DWV), el virus de la Parálisis aguda israelí (IAPV), el virus Kashmir (KBV) y el virus de la Cría ensacada (SBV) (Chen y Siede, 2007; vanEngelsdorp y Meixner, 2010).

Los virus pueden transmitirse de manera horizontal, vertical o ambas. La transmisión horizontal ocurre entre individuos de la misma colmena a través de la comida o el aire y es uno de los mecanismos de trasmisión de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV, SBV (Shen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006a; Chen y Siede, 2007; Ribière *et al.*, 2007). La transmisión vertical se da desde la línea maternal hacia la cría a través de la superficie de los huevos, o dentro de los mismos. Esta vía se ha propuesto para los virus BQCV, CBPV, DWV, KBV y SBV (Shen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006b; Yue *et al.*, 2007).

La mayoría de los virus producen enfermedades asintomáticas (Anderson y Gibbs, 1988), lo cual podría ocasionar un problema para el apicultor ya que éste no podría identificar si una colonia está infectada o no. Sin embargo, existen virus como KBV, DWV y CBPV que son capaces de expresar características típicas de sus enfermedades (Chen y Siede, 2007; deMiranda y Genersch, 2010; Ribière *et al.*, 2010)

A su vez, bajo ciertos estímulos la replicación de algunos virus puede ser estimulada, generando infecciones agudas y frecuentemente causando la muerte (Ribière *et al.*, 2010). Esta es una de las razones por las cuales los virus han sido vinculados con las pérdidas masivas de colmenas registradas principalmente en EEUU (vanEngelsdorp y Meixner, 2010).

1.4.1.1 Virus de las alas deformadas (DWV)

Dentro de los virus más comunes que afectan a la abeja se encuentra el DWV. Este es un virus de la familia *Flaviridae* perteneciente a la superfamilia de virus tipo picorna. Consiste en una partícula icosaédrica y posee tres proteínas estructurales VP1, VP2 Y VP3 (Berenyi *et al.*, 2007).

El mismo afecta a la abeja de forma asintomática en etapas de huevo y pupa de la abeja, causando rara vez la muerte (Chen y Siede, 2007). Sin embargo las abejas adultas presentan síntomas visibles: deformaciones en las alas e inclusive en ocasiones ausencia total de las mismas, abdomen hinchado y parálisis (Fig 1) (Chen y Siede, 2007).

Su primer detección se realizó Egipto en 1978 (Bailey *et al.*, 1978) y luego fue posible identificarlo en el resto del mundo con excepción a Oceanía (Chen y Siede, 2007).

Resultados de investigaciones en diferentes países han encontrado una gran prevalencia de este virus y amplio rango de ubicaciones geográficas (Tentcheva *et al.*, 2004b; Berenyi *et al.*, 2006). A su vez se ha reportado que el mismo tiene una incidencia estacional en abejas adultas y pupas con mayores

niveles de infección en verano a otoño (Tentcheva *et al.*, 2004a, b, Antúnez *et al.*, 2015).



Figura 1. Sintomatología observable de DWV. Se observa una abeja adulta con alas deformadas producto de la infección con DWV. (Miranda y Genersch, 2010)

1.4.1.2 Virus de la parálisis aguda (ABPV)

El virus ABPV ha sido asignado a la familia *Dicistroviridae* dentro de la superfamilia de virus tipo picorna (de Miranda *et al.*, 2010). La presencia de este virus ha sido reportada en toda América, Europa, Oceanía, Asia, África y Oriente medio (Allen y Ball, 1996, Ellis y Munn, 2005).

El ABPV afecta las abejas en la etapa adulta pero también puede ser detectado en etapas tempranas de su crecimiento (larva y pupa) (Bailey, 1965). El mismo se propaga por la vía salival, cuando una abeja adulta infectada alimenta a la larva o cuando la secreción salival se mezcla con el polen. Estas larvas mueren si ingirieron grandes cantidades de virus o sobreviven como abejas adultas infectadas (Bailey y Ball, 1991).

1.4.1.3 Técnicas para la detección de virus

Diferentes técnicas han sido utilizadas para la detección de virus en abejas, entre ellas: microscopia electrónica, inmunodifusión, ELISA y RT-PCR, siendo esta última una de las más utilizada por ser una herramienta rápida y sencilla. (Tentcheva *et al.*, 2004; Highfield *et al.*, 2009).

Sin embargo, con el fin de cuantificar el número de partículas virales y estimar el nivel de infección, actualmente se utiliza la técnica PCR en tiempo real (q-PCR), la cual constituye un método rápido, sencillo y sumamente sensible para la cuantificación de virus ARN (Bustin, 2002).

La técnica de q-PCR es similar a una PCR convencional, pero se incluye en la reacción una molécula reportera fluorescente que permite estimar la cantidad de ADN (o ADNc) (Heid *et al.*, 1996). Existen dos clases principales de moléculas fluorescentes, específicas y genéricas.

Las moléculas específicas son sondas fluorescentes (fragmento corto de ADN unido a un fluoróforo), que se une de forma específica a una secuencia de ADN de interés. La interpretación de los resultados suele ser rápida y directa.

Las moléculas genéricas son fluoróforos que se unen a todas las secuencias de ADN doble cadena. Los más utilizados son el SYBR Green y SYBR Gold (Lee *et al.*, 2004). Una vez unidos, emiten una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walker, 2002). Por lo tanto, un aumento en la cantidad de producto amplificado conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR (Ririe *et al.*, 1997). La principal limitación de estos marcadores es que al unirse a todo el ADN doble hebra, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos inespecíficos que pudieran formarse (por ejemplo, dímeros de *primers*). Para corroborar la identidad del amplicón, se analizan las curvas de desnaturalización. Estas se incluyen al final del ciclado y consisten en un aumento de temperatura de forma constante. De esta forma, a medida que aumenta la temperatura los productos amplificados se desnaturalizan y la fluorescencia decae. Es así, que es posible determinar la T_m o temperatura de desnaturalización, la cual es la temperatura en la cual el 50% de los productos se encuentran desnaturalizados y el 50% en forma de doble hebra. La T_m depende del largo del amplicón y de su contenido en GC, por lo que es característica de cada producto y permite corroborar su identidad (Ririe *et al.*, 1997).

1.4.2 *Varroa destructor*

El ácaro *Varroa destructor* (*V. destructor*) se encuentran entre los patógenos de mayor relevancia en la apicultura (Anderson y Trueman, 2000) ya que en general las colmenas no tratadas con acaricidas mueren (Dainat *et al.*, 2012; van Dooremalen *et al.*, 2012). El ciclo de vida de *V. destructor* posee una fase forética, sobre las abejas adultas, y una fase reproductiva, dentro de las celdas de las larvas (Fig 2).



Figura 2. Ciclo de vida resumido de *V. destructor*.

Este ácaro succiona la hemolinfa de las larvas que parasita provocando el nacimiento de obreras y zánganos de bajo peso, o incluso, causando la muerte prematura de las mismas (Shimanuki *et al.*, 1994; van Dooremalen *et al.*, 2012).

A su vez, se ha demostrado que *V. destructor* es capaz de deprimir la respuesta inmune de las abejas facilitando la entrada de diferentes patógenos (Shen *et al.*, 2005; Yang y Cox-Foster, 2005) y actuando como transmisor de

virus, entre ellos KBV, SBV, ABPV, IAPV y DWV (Bakonyi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004a; Yue y Genersch, 2005; Boecking y Genersch, 2008).

Asimismo se ha visto que la presencia del ácaro puede aumentar la prevalencia de los virus (Martin *et al.*, 2012) así como complicar los cuadros virales (Yang y Cox-Foster, 2005; 2007)

El virus ABPV junto con el ectoparásito *V. destructor* se han identificado como posible causa de despoblación de colmenas en Europa y Estados Unidos (Ball y Allen, 1988; Hung *et al.*, 1996; Berenyi *et al.*, 2006).

1.4.3 Microsporidio *Nosema spp*

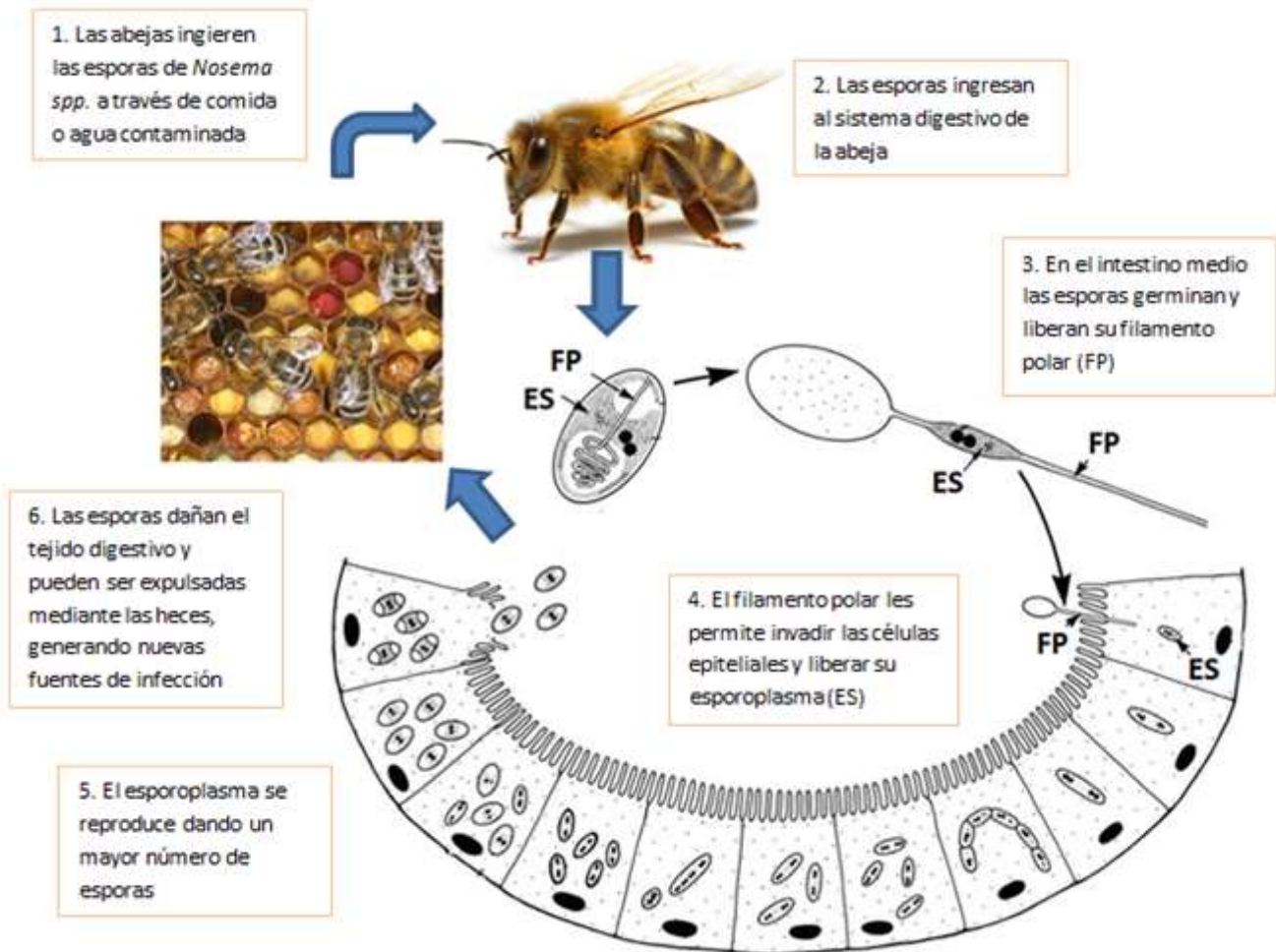
1.4.3.1 Generalidades

Los microsporidios son hongos unicelulares y parásitos intracelulares capaces de formar esporas (Franzen y Müller, 1999). Los mismos carecen de mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi y peroxisomas, contienen uno o dos núcleos y un filamento polar que se encuentra en espiral en el interior de las células (Romero, 2007). El número y la disposición de las vueltas del filamento polar varían entre géneros y especies (Romero, 2007).

1.4.3.2 Ciclo infeccioso de *Nosema spp.* en la abeja *Apis mellifera*

Las abejas ingieren los microsporidios en forma de esporas maduras a través de la comida o agua contaminada. Estas esporas ingresan al sistema digestivo y germinan en el intestino medio donde se dan las condiciones favorables para su germinación (Martin-Hernandez *et al.*, 2007). Allí liberan su filamento polar insertándolo en las células epiteliales y trasladan su esporoplasma (parásito infeccioso) hacia el interior de las mismas (Chen *et al.*, 2008). Una vez dentro de las células hospederas, se reproduce el material genético y se sintetizan todos los componentes estructurales de las esporas

utilizando la maquinaria de las mismas (Romero, 2007). Como resultado se ensamblan las esporas y las células intestinales estallan liberando todo su contenido (Fig 3) (Higes *et al.*, 2010a). De esta forma las esporas liberadas pueden invadir rápidamente el tejido digestivo y afectar también a las células regenerativas del mismo generando altas tasas de mortalidad de las abejas



melíferas (Martin-Hernandez *et al.*, 2007). A su vez, las esporas pueden ser expulsadas a través de las heces (Chen *et al.*, 2008) y permanecer viables durante más de un año generando nuevas fuentes de infección para la colonia (Fries, 1993).

Figura 3. Ciclo de infección del microsporidio *Nosema spp.* ES hace referencia al esporoplasma y FP al filamento polar.

1.4.3.3 *Nosema apis*, *Nosema ceranae* y *Nosema neumannii*

Existen tres especies de microsporidios capaces de infectar la abeja *Apis mellifera*: *Nosema apis* (*N. apis*), *Nosema ceranae* (*N. ceranae*) y *Nosema neumannii* (*N. neumannii*).

Debido a la gran similitud morfológica, las distintas especies de *Nosema* spp. podrían confundirse cuando son visualizadas bajo microscopía óptica (Fig 4). Sin embargo, las diferentes especies poseen ciertas diferencias estructurales. A través de la visualización por microscopía de transmisión electrónica la espora de *N. neumannii* presenta menor tamaño (Chemurot, 2017), seguida por *N. ceranae* y luego *N. apis*. (Fries, 2010). A su vez, el número de vueltas del filamento polar para *N. neumannii* es entre 10-12 (Chemurot, 2017), mientras que para *N. ceranae* es entre 20 y 23 y para *N. apis* alrededor de 30 (Fries *et al.*, 1996).

Por otro lado, las esporas de *N. ceranae* son más resistentes a la desecación y tienen mayor tolerancia térmica que las de *N. apis* (Fenoy *et al.*, 2009). También logran reproducirse y completar su ciclo endógeno mejor a diferentes temperaturas con respecto a *N. apis* (Martin-Hernandez *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2009).

N. ceranae puede deprimir la respuesta inmune de la abeja disminuyendo la expresión de péptidos antimicrobianos como abaecina e himenoptaecina, así como la enzima glucosa- deshidrogenasa mientras que *N. apis* activa la respuesta inmune (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012). Por lo tanto, además del daño directo causado en las abejas, *N. ceranae* puede actuar de forma indirecta favoreciendo la infección por otros patógenos (Becandristos *et al.*, 2010).

En cuanto a la estacionalidad, la prevalencia de *N. ceranae* aumenta hacia el invierno y disminuye hacia el verano (Fries, 2010), mientras que la mayor prevalencia de *N. apis* ocurre durante la primavera antes que las abejas de invierno sean reemplazadas por las abejas jóvenes (Fries, 2010).

Actualmente la prevalencia mundial de *N. ceranae* es mayor que la de *N. apis* (Klee *et al.*, 2007; Martin-Hernandez *et al.*, 2007). En Sudamérica se ha

verificado su presencia en Brasil (Klee *et al.*, 2007), Argentina (Medici *et al.*, 2012), Chile (Rodríguez *et al.*, 2012) y en Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2009).

Por otro lado *N. neumannii* fue encontrado por primera vez en Uganda, siendo mayor su incidencia que *N. apis* y *N. ceranae* en ese país (Chemurot, 2017). Allí también se reportó que la proporción de muestras positivas para este microsporidio fue mayor en la estación seca que en la húmeda (Chemurot, 2017). Debido al reciente reporte de este microsporidio en la abeja melífera, se cuenta con poca información vinculada a su biología, prevalencia, distribución y sus efectos en las abejas. Actualmente se está trabajando en un proyecto que involucran muestras de distintos países con el fin de analizar la distribución mundial de este microsporidio.

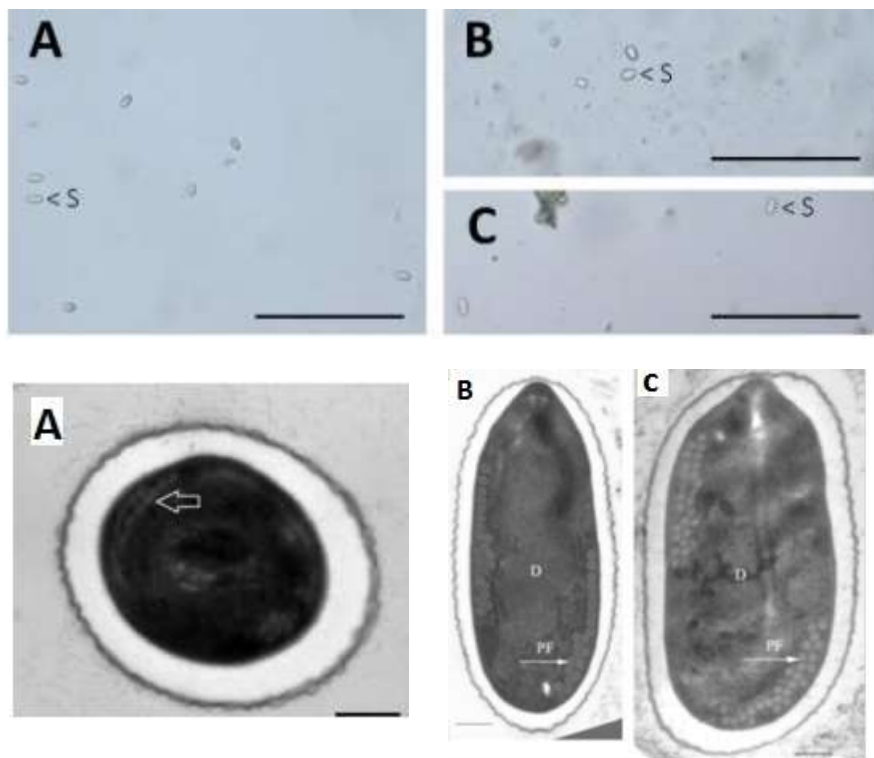


Figura 4. Estructura y morfología de las esporas de *N. neumannii*, *N. apis* y *N. ceranae*. Imágenes tomadas por microscopía de luz (arriba) y por microscopía de transmisión electrónica (abajo) en la que se pueden observar las diferencias de morfología entre las esporas de *N. Neumannii* (A), *N. ceranae* (B) y *N. neumannii* (C). Imágenes tomadas de Fries (2010) y Chemurot (2017).

1.4.3.4 Nosemosis

Nosema spp. causa la enfermedad conocida como nosemosis. En la abeja, dicha enfermedad afecta las funciones digestivas produciendo desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad (Fries, 1997; Hornitzky, 2008; Higes *et al.*, 2013).

Durante décadas se creyó que el único agente causante de nosemosis en abejas *A. mellifera* era *N. apis* (Fries, 2010), mientras que *N. ceranae* se asociaba a la abeja asiática *Apis ceranae* (Fries *et al.*, 1996). Sin embargo, en 2005 se reportó por primera vez que *N. ceranae* también parasita la abeja *A. mellifera* (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007),

N. ceranae ha sido asociado a las pérdidas de colmenas masivas en España (Higes *et al.*, 2008; 2009). Sin embargo, este es un punto polémico, ya que *N. ceranae* está distribuido mundialmente y no ha podido observarse dicha asociación en otros países (Foster *et al.*, 2007; Invernizzi, 2009; Paxton, 2010; Chen, 2010; Cox-Gisder *et al.*, 2010). Además, existen estudios en los cuales no se observan diferencias en cuanto a la virulencia de *N. ceranae* y *N. apis* a nivel de abejas individuales (Fries, 2010; Forsgren y Fries, 2010; Paxton, 2010). Esto puede ser explicado por diferentes motivos. En primer lugar, factores como la raza de abeja y el tiempo que han estado expuestos al patógeno pueden afectar la virulencia de *N. ceranae* (Fontbonne *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha planteado que la infección con distintas cepas de *N. ceranae* podría generar diferentes consecuencias cuando infectan la abeja *A. mellifera* (Dussaubat *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2014; Branchiccela *et al.*, 2016). Se ha visto que existe diversidad genética en la especie *N. ceranae* y estas diversas variantes podrían tener diferente virulencia (Pelin *et al.*, 2015; Branchiccela *et al.*, 2017). Por último, es posible que *N. ceranae* actúe en asociación con diferentes virus como lo hace *V. destructor* (Shen *et al.*, 2005; Chen y Siede, 2007). Esta interacción podría variar entre regiones, afectando a las abejas diferencialmente (Invernizzi *et al.*, 2009).

1.4.3.5 Control de *Nosema spp*

El antibiótico fumagilina, ha sido el tradicionalmente utilizado para controlar *N. apis* (Fries, 1997). Si bien se ha reportado ser eficiente también frente a *N. ceranae* (Williams *et al.*, 2008; 2011, Higes *et al.*, 2011) estudios nacionales sugieren que su efectividad es limitada (Mendoza *et al.*, 2016). Su uso en Uruguay está restringido solamente a los apiarios destinados a la cría de reinas (MGAP, 2010) y en los países Europeos se prohibió su utilización (Fries, 2010).

Por otro lado, se han desarrollado productos naturales a base de extractos de hierbas como Protofil y Api-Herb los cuales tienen un potencial en el control de *N. ceranae* (Chioveanu *et al.*, 2004, Nanetti *et al.*, 2009).

1.4.3.6 Técnicas de detección de *Nosema spp.*

La técnica más utilizada para detectar *Nosema spp.* es la microscopia óptica. Sin embargo, como se dijo anteriormente, la gran similitud en las morfologías de ambas especies dificulta su identificación.

En este sentido la técnica PCR ha adquirido relevancia, ya que es una prueba sensible que permite identificar la especie de *Nosema spp.* Además posibilita la detección del parásito en niveles muy bajos de infección y puede revelar todas las etapas de su ciclo (Martin Hernández *et al.*, 2007)

1.5 La apicultura en Uruguay

Al igual que lo que sucede en distintas partes del mundo, Uruguay se ha visto afectado por la problemática de despoblación de colmenas. La misma ocasiona entre un 20 y 30% de pérdidas anuales, estableciéndose como principales causas la desnutrición, problemas sanitarios y la intoxicación con pesticidas (Maggi *et al.*, 2016; Antúnez *et al.*, 2017).

Actualmente nuestro país cuenta con 3071 apicultores que manejan 587.512 colmenas (DIEGRA; 2016). La actividad apícola se basa en la producción de miel. De las 12.100 toneladas que se producen anualmente, el

92% es exportado principalmente a Estados Unidos, Alemania y España (DIEA; 2016).

Cabe destacar que los principales patógenos asociados a pérdidas de colmenas alrededor del mundo, están presentes y ampliamente distribuidos en Uruguay (Antúnez *et al.*, 2006; Invernizzi *et al.*, 2009; Anido *et al.*, 2016). Entre ellos el microsporidios *Nosema spp.*, diversos virus ARN, el ácaro *V. destructor* y la bacteria *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*) (Fig.5).

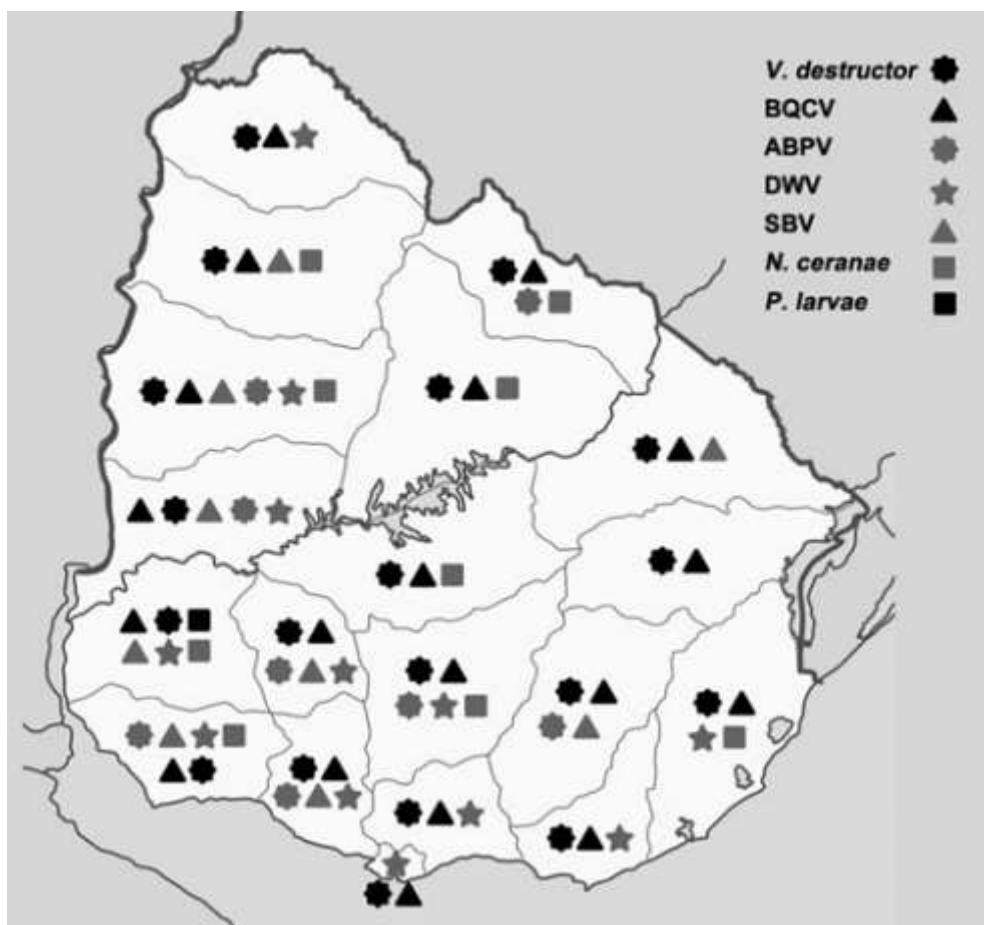


Fig.5. Distribución geográfica de los patógenos de *A. mellifera* en Uruguay (Anido *et al.*, 2016).

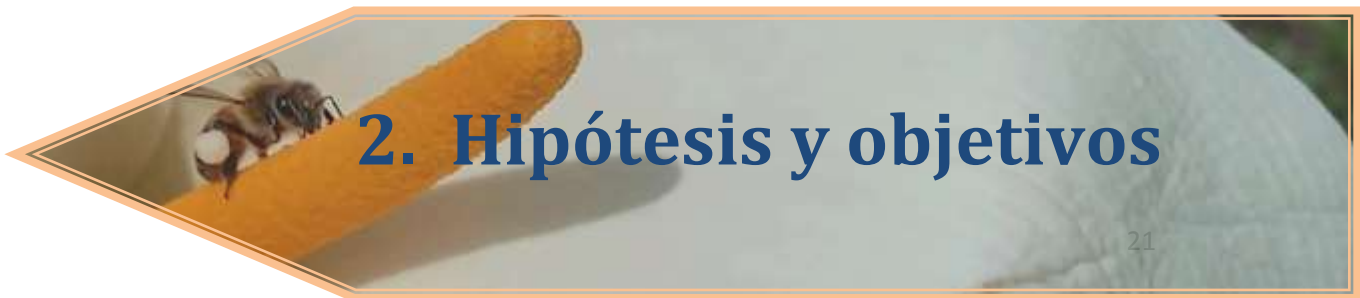
Una de las prácticas apícolas más comúnmente realizada por los apicultores uruguayos es el traslado de sus colmenas en febrero a las plantaciones de *Eucalyptus grandis* (*E. grandis*) al norte del país. Esto lo realizan como estrategia para extender su temporada de zafra e incrementar la

producción de miel ya que las plantaciones de *E. grandis* son sumamente nectaríferos. Además, su floración se da en otoño, etapa del año en que la oferta floral en el resto del país disminuye significativamente.

Sin embargo, las colmenas ubicadas en dichas plantaciones se debilitan sensiblemente corriendo riesgo de no sobrevivir a la invernada si no son retiradas a tiempo al final de la floración (Mendoza *et al.*, 2012). Distintos factores podrían estar involucrados en dicho debilitamiento. Por una parte, el gran flujo de néctar conlleva a una actividad intensa de las colmenas en una etapa del año en que las mismas tendrían que prepararse para invernar, lo cual determina que las mismas se estresen notoriamente.

A su vez, en este ambiente las colmenas se infectan indefectiblemente con el microsporidio *N. ceranae* provocando grandes problemas sanitarios (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2012).

Además, otro factor que estaría contribuyendo a esta problemática, es la desnutrición que experimentan las colmenas en dichas plantaciones. Dicha desnutrición estaría vinculada a la alimentación con un único polen, proveniente de *E. grandis*, el cual carece de un buen balance de aminoácidos y tiene bajo contenido en lípidos (de Groot, 1953; Somerville, 2001).



2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo plantea que la suplementación con polen polifloral de abejas *Apis mellifera* sometidas a estrés nutricional influye en la susceptibilidad de las mismas frente a la infección con distintos patógenos.

2.2 Objetivo general

El objetivo general consiste en analizar el impacto de la suplementación con polen polifloral en la fortaleza y salud de colmenas sometidas a estrés nutricional ubicadas en una plantación de *Eucalyptus grandis*.

2.3 Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de la suplementación con polen polifloral en colmenas sometidas a estrés nutricional en la población de abejas adultas

- Analizar el impacto de la suplementación con polen polifloral en colmenas sometidas a estrés nutricional, en el nivel de infección por
 - virus ABPV y DWV.
 - el microsporidio *Nosema spp.*

- Determinar la relación entre la infección con *Nosema spp.*, los virus ABPV y DWV con la población de abejas adultas.



3. Materiales y métodos

Esta tesis de grado fue realizada en el marco del proyecto CSIC I+D C624 "Efecto de la nutrición en la infección por *Nosema ceranae*, *Crithidia mellificae* y virus ARN en las abejas melíferas".

3.1 Preparación de la torta de polen polifloral

Previo al comienzo del ensayo, se conformó una torta de polen polifloral. Para esto se tomaron cuadros conteniendo polen de diverso origen botánico de no más de un año de edad de colmenas pertenecientes a INIA La Estanzuela. Dicho polen se extrajo utilizando una máquina diseñada para tal fin (*Bee Bread Harvester Mini*, Wilara JSC, Lituania). Para la realización de la torta se mezcló el polen con jarabe de sacarosa al 50% en una proporción de 9kg de polen por cada 600mL de jarabe. La mezcla se dividió en contenedores de medio kg cada uno ("tortas de polen") y se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser administradas a las colmenas.

3.2 Instalación del apiario experimental

En setiembre de 2014 se criaron 60 reinas hermanas y se formaron núcleos (pequeñas colmenas conteniendo 4 cuadros). Dichos núcleos se desarrollaron durante la primavera y verano en colmenas de 10 cuadros. Previo al comienzo del experimento, las mismas se estandarizaron en 6 cuadros cubiertos por cría, dos cuadros de cera labrada y dos cuadros con miel. Dichas actividades fueron realizadas por técnicos de la sección apicultura de INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay).

3.3 Diseño experimental

A principios de marzo de 2015 (05/03/2015, Muestreo 1, tiempo 0) todas las colmenas se muestrearon. Dichos muestreos consistieron en abejas nodrizas destinadas a análisis de virus y de abejas pecoreadoras, para análisis de *Nosema spp.* Asimismo, se registró la cantidad de abejas adultas para estimar la fortaleza de las colmenas según se describe en la sección 3.7.

Luego de 5 días (10/03/2015) las colmenas fueron trasladadas a una plantación de *E. grandis* en Rivera (31° 15'51.73" S, 55° 39'23.8" W) instalándose el apiario experimental. Las mismas se dividieron al azar en dos grupos de 30 colmenas cada uno (grupos M y P). Las colmenas del grupo P se suplementaron el día del traslado y cada 15 días con una torta de polen polifloral cada una (durante 2 meses: muestreos 2; 3; 4 y 5). Además, se realizaron los muestreos según se describió previamente. Las colonias del grupo M sólo se alimentaron con el polen disponible de *E. grandis*.

En todos los casos las muestras de abejas nodrizas llegaron vivas al Departamento de Microbiología del IIBCE y se almacenaron a -80°C para evitar la degradación del ARN viral mientras que las abejas pecoreadoras se almacenaron en etanol a 4°C hasta ser analizadas.

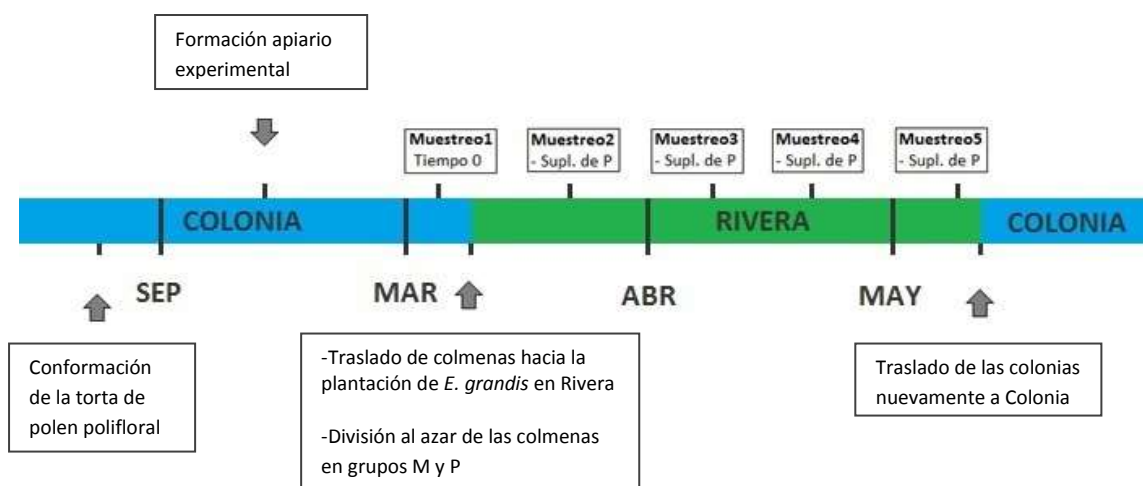


Figura 6. Esquema gráfico, temporal y espacial de cómo se llevó a cabo el experimento.

3. 4 Estimación de la fortaleza de las colmenas

La fortaleza de las colmenas se estimó en base a la población de abejas adultas. Para esto se empleó el método subjetivo propuesto en el libro de métodos estándar para la investigación en *A. mellifera* (Delaplane *et al.*, 2013), que consiste en contar los cuadros completos de abejas en cada colmena. Para determinar la cantidad de abejas por colmena, se multiplica la cantidad de cuadros por 1215 (se estima que cada cuadro contiene aprox. 1215 abejas).

Todas las actividades descritas en las secciones 3.1, .3.2, 3.3 y 3.4 fueron llevadas a cabo previo al comienzo de esta tesis por investigadores del IIBCE, Facultad de Ciencias e INIA.

3. 5 Análisis del nivel de infección con virus

Con el fin de estimar el nivel de infección viral se seleccionaron al azar 20 abejas nodrizas de cada muestra, y se homogeneizaron en 10mL de PBS 1X frío (NaCl 8.2g, Na₂HPO₄ 1.7g, KH₂PO₄ 0.41g por litro de H₂O_d) durante 2 minutos a alta velocidad en un homogeneizador Stomacher (LabSystem, Seward). El homogeneizado resultante se filtró y se centrifugó a 1.500 g durante 10 min a 4°C para sedimentar los fragmentos más grandes de abeja y luego se sometió a una segunda centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 4°C.

La extracción de ARN viral se realizó empleando 500µL del sobrenadante obtenido utilizando el kit comercial PureLink RNA/DNA Mini kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Diez µL del ARN obtenido co-purificado con ADNg se digirió empleando DNasa I (Invitrogen) y el ARN se retrotranscribió a ADNc mediante el kit comercial High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADNc obtenido se diluyó al décimo en a H₂O_d estéril libre de RNasa/DNasa, y se almacenó a -20°C.

El procesamiento de las muestras, extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc se desarrollaron previo al inicio de esta tesis. Al

iniciar la misma se contaba con el ADNc de las diferentes muestras almacenados a -20°C.

La detección y cuantificación de los virus ABPV y DWV se realizó mediante la técnica PCR en tiempo real. Para esto, se utilizaron los protocolos descritos por Johnson *et al.*, (2009) y Kukielka *et al.*, (2008), los cuales ya se encontraban puestos a punto en el Departamento de Microbiología del IIBCE.

Se utilizaron cebadores específicos para los dos virus ABPV y DWV (Tabla 1). Por otro lado, se amplificó un fragmento del gen que codifica para la β -actina y otro fragmento correspondiente al RPS-5, utilizando cebadores específicos para los mismos (Tabla 1). Éstos, son genes de expresión constitutiva de la abeja y se emplearon para corroborar la correcta extracción de ARN, así como para la cuantificación relativa del nivel de infección.

La mezcla de reacción consistió en 10 μ L de Power SYBR Green PCR Master Mix, 0,12 μ L de cada cebador (un par de cebadores por reacción), agua libre de RNAasas y 2 μ L de ADNc en un volumen final de 20 μ L. En todas las corridas se incluyeron controles negativos y un estándar apropiado (para cada virus y para los genes de referencia, β -actina y RPS5). El estándar se generó realizando diluciones seriadas 1/5 a partir de una mezcla de todos los ADNc analizados. La inclusión de esta curva es necesaria para calcular la eficiencia de reacción.

El programa de ciclado consistió en una preincubación a 95°C durante 10 min, y 40 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 50°C y 30 seg a 60°C. La especificidad de la reacción se verificó mediante la inclusión de una curva de desnaturalización o melting de los productos amplificados (de 65 a 95°C). Se utilizó el equipo BioRad CFX.

La cuantificación de los niveles de infección con ABPV y DWV se realizó de forma relativa utilizando la media geométrica de la expresión de los genes β - actina y RPS5 mediante el método descrito por Pfaffl (2001).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección de los patógenos ABPV, DWV y los genes de expresión constitutiva B-actina y RPS5.

Primer	Secuencia 5´-3´	Virus/gen	Tamaño predicho del amplicón	Tm (°C)	Referencia
ABPV 1	ACCGACAAAGGGTATGATGC	ABPV	124	74.5-	Johnson <i>et al.</i> , 2009
ABPV 2	CTTGAGTTTGCGGTGTTCT			76	
DWV 1	CTGTATGTGGTGTGCCTGGT	DWV	260	79	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
DWV 2	TTCAAACAATCCGTGAATATAGTGT				
BACTIN 1	ATGCCAACACTGTCCTTCTGG	B-actina	148	78.5	Yang y Cox-Foster, 2005
BACTIN 2	GACCCACCAATCCATACGGA				
RPS5 1	AATTATTTGGTGCCTGGAATTG	RpS5	115	73	Thompson <i>et al.</i> , 2007
RPS5 2	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA				

3.6 Análisis del nivel de infección con *Nosema spp*

El nivel de infección con *Nosema spp.* se estimó en 10 colmenas del grupo M y 10 del grupo P, las cuales se eligieron al azar al inicio del ensayo. Este análisis se realizó en abejas pecoreadoras, ya que se ha visto que las mismas son el indicador más confiable para estimar el nivel de nosemosis (Higes *et al.*, 2010).

Para determinar el nivel de infección con *Nosema spp.* se siguió el protocolo descrito por Fries *et al.*, (2013). Para esto se homogeneizaron 30 abejas pecoreadoras individualmente en 1mL de agua destilada (H₂O_d) estéril y se registró la presencia o ausencia de esporas de *Nosema spp* mediante microscopía óptica (400X).

Se calculó la proporción de abejas infectadas en relación al total analizadas para cada colmena.

3.7 Determinación de la especie de *Nosema spp.*

La determinación de la especie de *Nosema spp.* se realizó en las 10 muestras analizadas de cada grupo al principio y final del ensayo (muestreos 1 y 5).

Se procesó un pool de 20 abejas pecoreadoras en 10mL de PBS estéril durante 2 min a máxima velocidad en un homogeneizador *Stomacher* (LabSystem, Seward). Los homogeneizados se filtraron y se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min para concentrar las esporas de *Nosema spp.* Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2mL de PBS estéril.

A partir de dicho material se realizó la extracción de ADN empleando el kit comercial Pure Link Genomic DNA mini kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones pautadas por el fabricante.

Para determinar la especie de *Nosema spp.* se utilizó la técnica multiplex PCR con cebadores específicos para *N. apis* y *N. ceranae* (Tabla 2) (Martín-Hernández *et al.*, 2011). La mezcla de reacción consistió en 0,4mM de dNTPs, 3mM MgCl₂, 0,4µM de cada cebador, 2U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Life technologies, Brasil), 1X buffer de la enzima (Invitrogen, Life technologies, Brasil), 5µL de ADN y agua mQ estéril, en un volumen final de 25µL. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, seguido de 10 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 61.8°C y 45 seg a 72°C; 20 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 61.8°C y 50 seg a 72°C con 5 seg adicionales en la elongación en cada ciclo sucesivo, y una extensión final durante 7 min a 72°C. En todas las corridas se incluyeron controles negativos, así como controles positivos para *N. apis* y *N. ceranae*.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la detección de los patógenos *N. apis*, *N. ceranae*.

Primer	Secuencia 5'-3'	Gen	Organismo	Tamaño predicho del amplicón	Referencia
NapisF	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA	ARNr	<i>N. apis</i>	218-219	Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007
NapisR	GGGGGGCGTTTAAATGTGAAACAACACTATG	16S			
NcerF	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA	ARNr	<i>N. ceranae</i>	321	Martín-

NcerR	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG	16S			Hernández <i>et al.</i> , 2007
--------------	----------------------------	-----	--	--	-----------------------------------

Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en TBE 0.5X (Tris 10,8g, ácido bórico 5.5g, EDTA 0.5M pH 8, 4mL por 100mL), a 110V durante 45 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus (Thermo Fisher Scientific). El gel de agarosa se tiñó con GelRed (Olerup SSP, Stockholm, Swedan) y se visualizó bajo luz UV.

3.8 Análisis de resultados

En una primera instancia se determinó si los datos de población de abejas, y niveles de infección cumplen con los supuestos de estadística paramétrica: normalidad y homogeneidad de varianza. La normalidad se estudió realizando el Test de Kolmogorov-Smirnov de comparación entre dos muestras corregido por Lilleford. La homogeneidad de varianza se determinó mediante el Test de Levene.

Con el fin de estudiarla dinámica de cada grupo a lo largo del tiempo, aquellos datos que cumplieron con los supuestos de estadística paramétrica se analizaron mediante el test ANOVA y Scheffee a posteriori, mientras que los que no cumplieron dichos supuestos se analizaron mediante el test de Kruskall Wallis y Mann Whitney a posteriori.

Por otro lado, se comparó los niveles de infección de los distintos patógenos y la población de abejas de las colmenas de los grupos M y P en cada muestreo. Para esto se utilizó el test de T- student para comparar aquellos datos que cumplieron con los supuestos de estadística paramétrica, y mediante el test de Man Whitney para aquellos datos que no los cumplieron.

Por último, con el objetivo de analizar las asociaciones entre la infección con los distintos patógenos y la población de abejas, se analizó la correlación entre dichas variables en el grupo M y P mediante el test de correlación de Spearman. Dicha asociación se estudió en ambos grupos por separado, ya que la dinámica de estas variables podría ser diferente debido al tratamiento.

En todos los casos se utilizó un nivel de confianza del 95% y todos los análisis fueron realizados empleando el Software Statistica 7.



4.1 Población de abejas adultas

Al inicio del experimento todas las colmenas presentaron una población similar de abejas adultas (Mann-Whitney $p=0,99$, $U=479,5$). Dicha población aumentó en ambos grupos hacia el muestreo 2 (Mann-Whitney M1 vs M2 $p=0,0022$, $U=266,0$; P1 vs P2 $p\leq 0,001$, $U=117,0$). En el caso de las colmenas del grupo M la población de abejas disminuyó progresivamente hasta el muestreo 5 (Mann-Whitney M2 vs M3 $p=0,022$, $U=319,0$; M3 vs M4 $p=0,0036$, $U=256,0$; M4 vs M5 $p=0,0038$, $U=227,0$), mientras que la de las colmenas del grupo P disminuyó hasta el muestreo 3 (Mann-Whitney P2 vs P3 $p\leq 0,001$, $U=206,5$) pero luego se mantuvo constante hasta el muestreo 5 (Mann-Whitney P3 vs P4 $p=0,67$, $U=421,5$; P4 vs P5 $p=0,047$, $U=283,5$) (Fig 7).

Por otro lado, las colmenas del grupo P presentaron mayor población de abejas adultas en comparación a las del grupo M en los muestreos 2 (Mann-Whitney $p=0,042$, $U=337,5$), 4 (Mann-Whitney $p=0,0045$, $U=240,5$) y 5 (Mann-Whitney $p\leq 0,001$, $U=179,0$). En el caso del muestreo 3, si bien las colmenas del grupo P tuvieron mayor población de abejas adultas, dicha diferencia no fue significativa (Mann-Whitney $p=0,58$, $U=441,5$) (Fig 7).

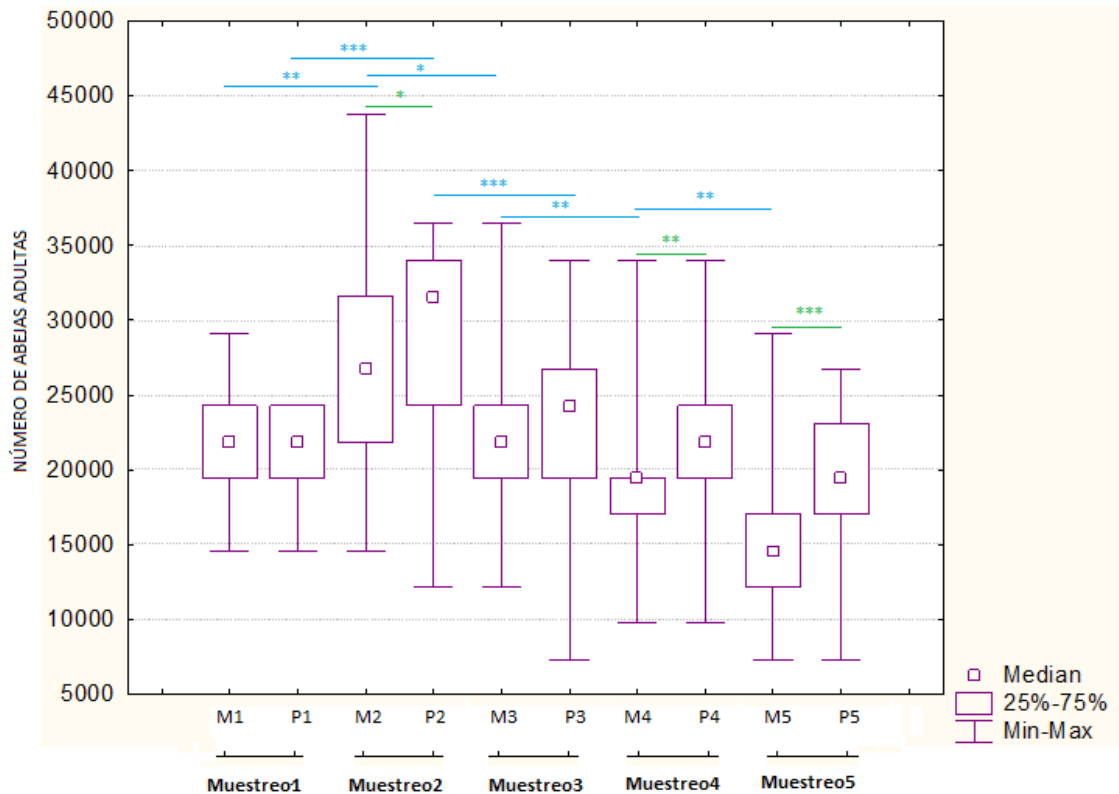


Figura 7. Población de abejas adultas en las colmenas de los grupos M y P durante su estadía en la plantación de *E. grandis*. En verde se indican las diferencias significativas entre los grupos de abejas alimentados con polen monofloral y polifloral de cada muestreo. En celeste se indican las diferencias significativas a través del tiempo entre grupos. (*: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$).

4.2 Nivel de infección con virus

Se detectaron los virus ABPV y DWV en la mayoría de las muestras analizadas (Fig 8 y 9, respectivamente). Al analizar la curva de *melting* de los productos obtenidos, en todos los casos se obtuvo un pico cuya temperatura de fue específica para cada uno de los virus

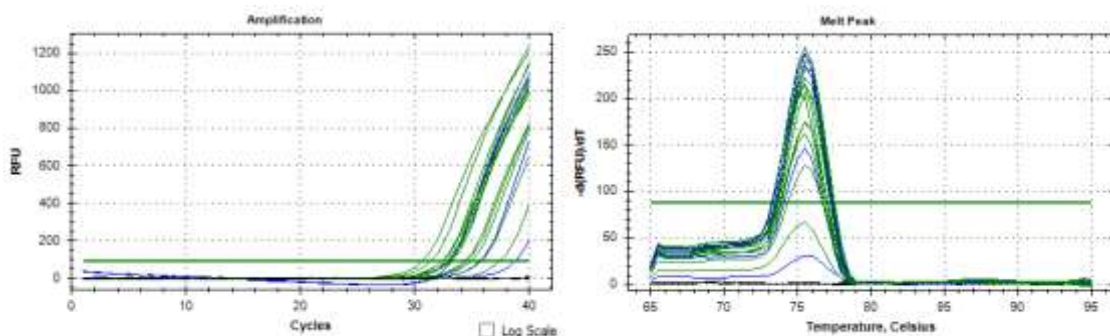


Figura 8. Ejemplo de a) curva de amplificación del virus ABPV, y b) temperatura de melting (T_m). En celeste se marcan los estándares, en verde las muestras y en negro los controles negativos.

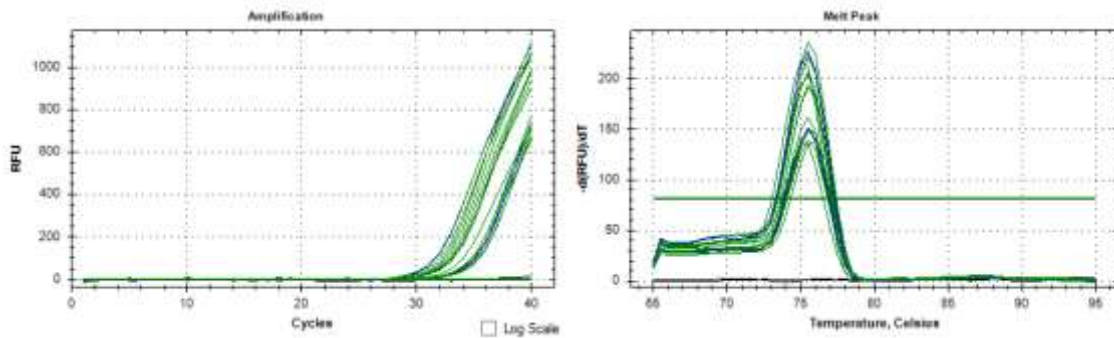


Figura 9. Ejemplo de a) curva de amplificación del virus DWV, y b) temperatura de melting (T_m). En celeste se marcan los estándares, en verde las muestras y en negro los controles negativos.

4.2.1 ABPV

Al inicio del experimento, las colmenas pertenecientes a ambos tratamientos presentaron similares niveles de infección con ABPV. Dichos niveles variaron a través del tiempo, tanto en las abejas del grupo M como en las del grupo P. El nivel de infección del grupo M se mantuvo constante hasta el muestreo 2 (Mann-Whitney M1 vs M2 $p=0,060$, $U=566,0$) y disminuyó hasta el muestreo 3 (Mann-Whitney M2 vs M3 $p\leq 0,001$, $U=77,0$). Posteriormente aumentó hasta el muestreo 4 (Mann-Whitney M3 vs M4 $p\leq 0,001$, $U=76,0$) y volvió a disminuir en el muestreo 5 (Mann-Whitney M4 vs M5 $p=0,0015$, $U=157,0$) (Fig 10).

En cuanto a las colmenas del grupo P, se observó que el nivel de infección con este virus aumentó significativamente desde el muestreo 1 hasta al 2 (Mann-Whitney P1 vs P2 $p\leq 0,001$, $U=30,0$). Sin embargo, desde el muestreo 2 al 3 los niveles de infección disminuyeron (Mann-Whitney P2 vs P3 $p<0,001$, $U=2,0$) y volvieron a aumentar hasta el muestreo 4 (Mann-Whitney P3 vs P4 $p=0,00026$, $U=124,0$), manteniéndose constante hasta el muestreo 5 (Mann-Whitney P4 vs P5 $p=0,91$, $U=306,0$) (Fig 10)

En todos los muestreos (a excepción del muestreo 1) (Mann-Whitney M1 vs P1 $p=0,36$, $U=265,0$), las colmenas del grupo P presentaron mayor nivel de infección con este virus que las colmenas del grupo M (Mann-Whitney M2 vs P2 $p\leq 0,001$, $U=30,0$; M3 vs P3 $p\leq 0,001$, $U=965,0$; M4 vs P4 $p\leq 0,001$, $U=19,0$; M5 vs P5 $p\leq 0,001$, $U=0,0$) (Fig 10).

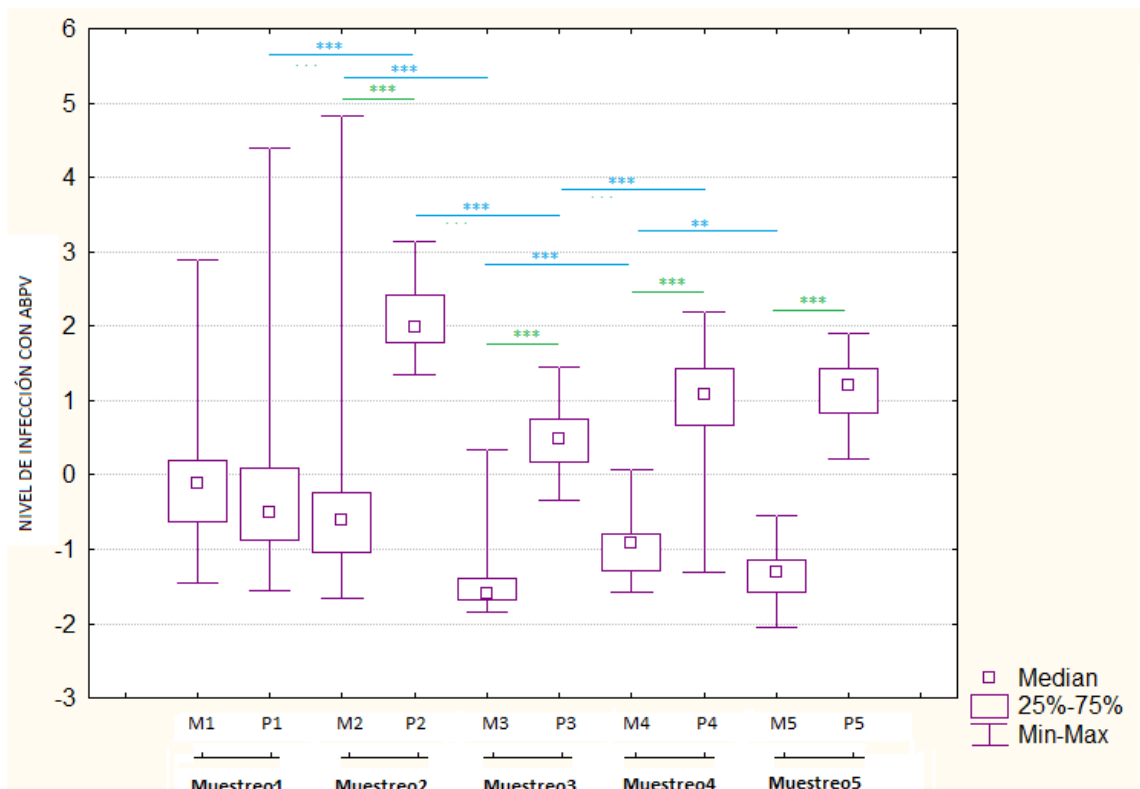


Figura 10. Nivel de infección con ABPV. En verde se indican las diferencias significativas entre los grupos de abejas alimentados con polen monofloral y polifloral de cada muestreo. En celeste se indican las diferencias significativas a través del tiempo entre grupos. (*:P ≤0,05; **:P≤0,01; ***:P ≤0.001).

4.2.2 DWV

Al inicio del experimento todas las colmenas presentaron similar nivel de infección con DWV (Mann-Whitney $p=0,27$, $U=245,0$). En el grupo M dicho nivel de infección aumentó hasta el muestreo 2 (Mann-Whitney M1 vs M2 $p\leq 0,001$, $U=127,0$) y luego disminuyó hasta el muestreo 3 (Mann-Whitney M2 vs M3 $p\leq 0,001$, $U=76,0$). Posteriormente se mantuvo constante hasta el muestreo 4 (Mann-Whitney M3 vs M4 $p=0,66$, $U=265,0$) y volvió a aumentar al muestreo 5 (Mann-Whitney M4 vs M5 $p=0,0032$, $U=160,0$).

La dinámica de infección con este virus en el grupo P, aumentó y disminuyó consecutivamente en cada muestreo (Mann-Whitney P1 vs P2 $p\leq 0,001$, $U=17,0$; P2 vs P3 $p\leq 0,001$, $U=41,0$; P3 vs P4 $p\leq 0,001$, $U=32,0$; P4 vs P5 $p\leq 0,001$, $U=100,0$) (Fig 11).

Por otro lado, si bien las colmenas de ambos grupos presentaron similares niveles de infección con DWV en el muestreo 2 (Mann-Whitney $p=0,73$, $U=163,0$), las colmenas del grupo P presentaron mayor nivel de infección con DWV en los muestreos 3, 4 y 5. (Mann-Whitney M3 vs P3 $p=0,0032$, $U=123,0$; M4 vs P4 $p\leq 0,001$, $U=0,0$; M5 vs P5 $p\leq 0,001$, $U=87,0$) (Fig 11)

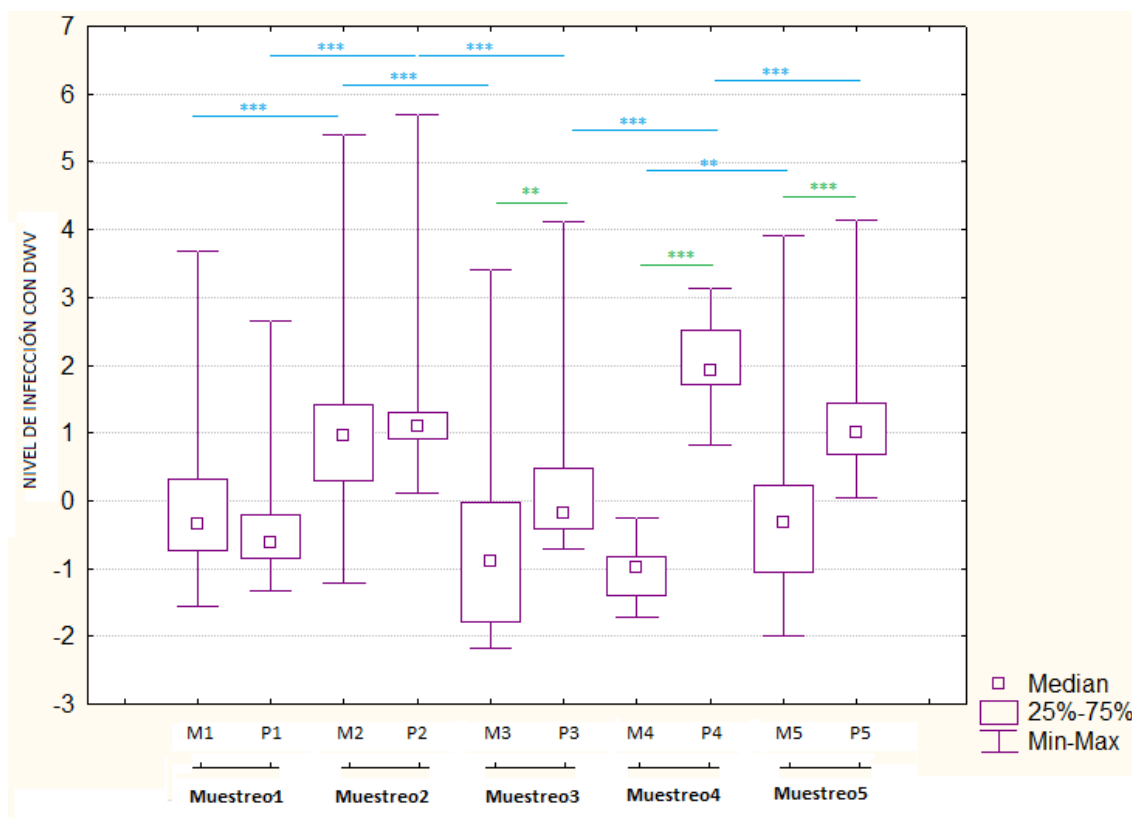


Figura 11. Nivel de infección con DWV. En verde se indican las diferencias significativas entre los grupos de abejas alimentados con polen monofloral y polifloral de cada muestreo. En celeste se indican las diferencias significativas a través del tiempo entre grupos. (*: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$).

4.3 Nivel de infección con *Nosema spp*

Al inicio del experimento todas las colmenas presentaron similar nivel de infección con *Nosema spp*. (Mann-Whitney $p=0,33$, $U=33,0$) y luego aumentaron para los dos grupos en el tiempo. Dicho aumento fue constante hasta el muestreo 5 en las colmenas del grupo M llegando al 100% de abejas infectadas (Mann-Whitney M1 vs M2 $p\leq 0,001$, $U=4,0$; M2 vs M3 $p\leq 0,001$, $U=1,0$; M3 vs M4 $p\leq 0,001$, $U=3,5$; M4 vs M5 $p=0,013$, $U=17,5$). Por otro lado en

las colmenas del grupo P el aumento fue sostenido hasta el muestreo 4 (Mann-Whitney P1 vs P2 $p \leq 0,001$, $U=4,0$; P2 vs P3 $p=0,0028$, $U=10,5$; P3 vs P4 $p=0,0017$, $U=9,0$), y luego se mantuvo constante, llegando aproximadamente a un 80% de abejas infectadas (Fig 12).

Por otra parte, las colmenas del grupo P presentaron un nivel de infección significativamente menor que las del grupo M en los muestreos 4 y 5 (Mann-Whitney M4 vs P4 $p=0,0074$, $U=15,0$; M5 vs P5 $p=0,0012$, $U=7,5$) (Fig 12).

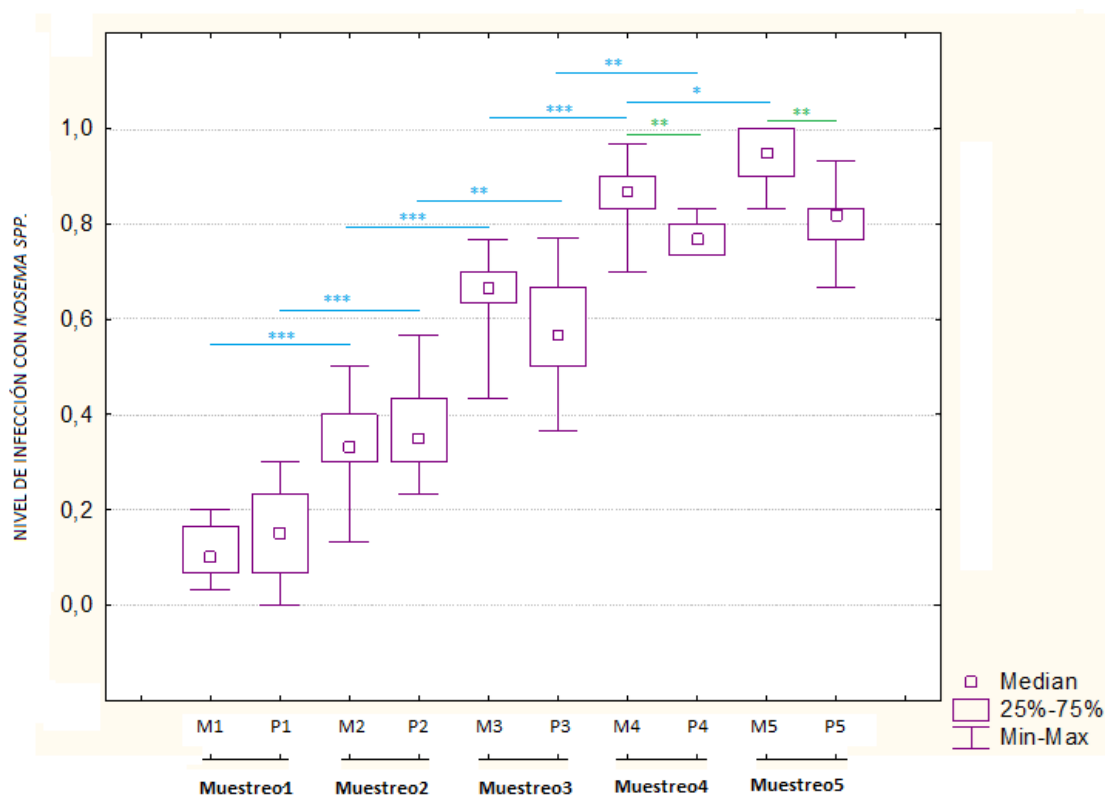


Figura 12. Nivel de infección por *Nosema spp* (proporción de abejas infectadas). En verde se indican las diferencias significativas entre los grupos de abejas alimentados con polen monofloral y polifloral de cada muestreo. En celeste se indican las diferencias significativas a través del tiempo entre grupos. (*: $P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$; ***: $P \leq 0,001$).

4.4 Determinación de la especie de *Nosema spp*.

Todas las muestras estudiadas fueron positivas para *N. ceranae* observándose una única banda producto de amplificación a la altura de 218 pb. Solo un caso fue positivo también para *N. apis* (carril 1) presentando una banda

a la altura de 321pb, es decir que esta muestra presentó una co-infección. (Fig. 13). Dicha co-infección fue en una muestra positiva del muestreo 1.

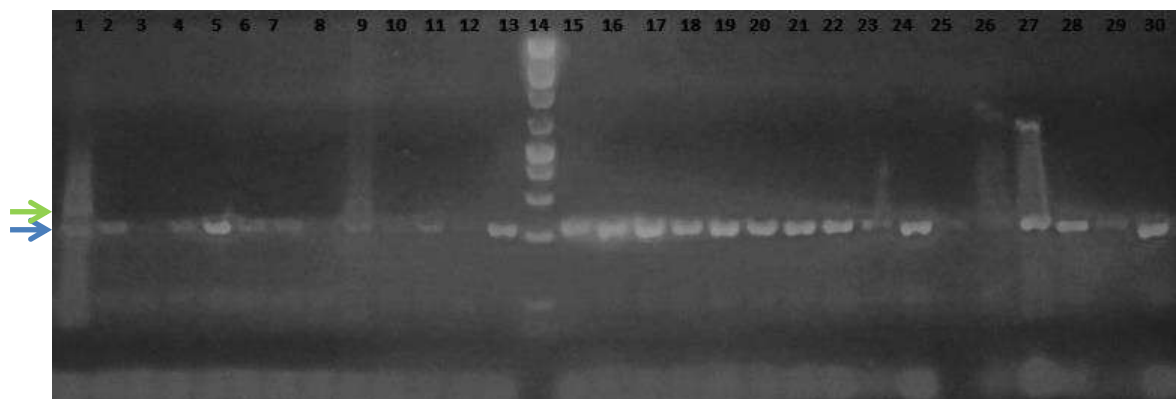


Figura 13: Ejemplo de gel de agarosa con los productos de amplificación por PCR multiplex del fragmento del gen ARNr 16S de *N. ceranae* y *N. apis* utilizando cebadores específicos para estos microsporidios. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 218pb (flecha azul) y el de *N. apis* en 321 pb (flecha verde). Carriles 1-13 y 15-29: muestras problema; carril 14: marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb Plus, Thermo); Carril 30: control positivo de *N. ceranae*.

4.5 Asociación entre los niveles de infección con patógenos y la población de abejas adultas

En el grupo M, el nivel de infección con *Nosema spp.* se asoció negativamente con la población de abejas adultas (Spearman $p=0,0051$, $rs=-0,40$). En las colmenas del grupo P, dicha asociación no fue significativa (Spearman $p=0,17$, $rs=-0,20$).

Por otro lado, la población de abejas adultas del grupo P y los niveles de infección con el ABPV mostraron una asociación positiva (Spearman ABPV $p=0,035$, $rs=0,19$). Sin embargo, las colmenas del grupo M no presentaron dicha asociación (Spearman ABPV $p=0,25$, $rs=0,10$).

Los niveles de infección con el DWV no se correlacionaron con la población de abejas adultas en las colmenas del grupo P (Spearman, DWV-P $p=0,25$, $rs=0,11$). En el caso de las colmenas del grupo M, ambas variables mostraron una asociación positiva marginalmente significativa (Spearman, DWV-M $p=0,052$, $rs=0,18$).



Los reportes de pérdidas masivas de colmenas de abejas *A. mellifera* en los últimos años en distintas partes del mundo (Ellis *et al.*, 2010; Neumann y Carreck, 2010) han motivado la realización de diversos estudios científicos para cuantificar estas pérdidas e identificar sus causas (Chen *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2008; Neumann y Carreck, 2010). La infección por patógenos como el microsporidio *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008; 2009), distintos virus (vanEngelsdorp y Meixner, 2010) así como la desnutrición de las abejas (vanEngelsdorp y Meixner, 2010) se han identificado como las principales causas de este problema.

En este trabajo se planteó como objetivo principal analizar el impacto de la suplementación con polen polifloral en la población de abejas adultas y nivel de infección con *Nosema spp.* y los virus ABPV y DWV de colmenas sometidas a estrés nutricional.

Durante el transcurso de este experimento (marzo – mayo), se observó una disminución en la población de abejas adultas. Dicha disminución coincidió con el comienzo de la invernada y forma parte del ciclo biológico de las colonias.

En este período, las 60 colmenas se infectaron con *Nosema spp.* detectándose *N. ceranae* en todas las muestras analizadas, mientras que *N. apis* se encontró solo en una muestra. Esto coincide con estudios previos realizados en nuestro país, que indican que *N. ceranae* es el microsporidio predominante (Invernizzi *et al.*, 2009). Resultados similares se han obtenido en diferentes países alrededor del mundo, incluyendo Francia, España, Estados Unidos, Chile y Argentina (Chauzat *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Invernizzi *et al.*, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Traver y Fell, 2011; Martínez *et al.*, 2012; Medici *et al.*, 2012).

La rápida infección con *N. ceranae* de las colmenas trasladadas a las forestaciones de *E. grandis* coincide con lo reportado previamente por Invernizzi *et al.*, (2011) quienes sugieren que esto puede deberse a que las altas condiciones de humedad promueven la replicación de este patógeno, así

como a deficiencias nutricionales vinculadas al déficit de este polen (Somerville, 2001). Los resultados obtenidos en este experimento apoyan esta hipótesis, ya que las colmenas suplementadas con polen de origen polifloral presentaron un menor nivel de infección con *Nosema spp.* que aquellas colmenas que no recibieron suplementación. Esto podría deberse a una mejora de la respuesta inmune de la abeja, dado que se ha reportado que la alimentación influye en la expresión de genes vinculados a la inmunidad (Alaux *et al.*, 2010; di Pasquale *et al.*, 2013; Castelli *et al.*, 2015).

Además de afectar el nivel de infección por *Nosema spp.*, la suplementación nutricional afectó también la población de abejas. Las colmenas que recibieron suplementación (y presentaron menor nivel de infección por *Nosema spp.*), presentaron mayor población de abejas.

N. ceranae infecta las células epiteliales del intestino y altera la absorción de nutrientes (Higes *et al.*, 2013). Como consecuencia la abeja debe consumir más alimentos para suplir las necesidades energéticas y nutricionales básicas (Martín-Hernández *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012; Higes *et al.*, 2013). De esta forma *N. ceranae* es capaz de alterar el ciclo de vida de la abeja, promoviendo que la misma salga a pecorear más tempranamente y envejezca más rápido (Alaux *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012). Esto genera un acortamiento de la vida media de la abeja y un mayor desgaste energético, lo cual a nivel colonial se traduce en la reducción de la población (Higes *et al.*, 2008; 2009).

En cuanto a las infecciones virales, el nivel de infección de los virus ABPV y DWV durante el experimento fue variable. Dentro de los motivos que podrían haber influido en estas variaciones, se destacan factores climáticos, como lluvia, temperatura y viento, los cuales tienen un fuerte impacto en la incidencia anual y estacional de los virus (Tentcheva, 2004).

Las colmenas suplementadas con polen polifloral presentaron mayores niveles de infección viral respecto a las colmenas no suplementadas. Esto podría deberse a distintos motivos. En primer lugar, la célula huésped brinda las enzimas necesarias para la síntesis proteica, los ribosomas, los tRNA y la

producción de energía (Tortora *et al.*, 2007). Por ende, los virus que infectan abejas mejor nutridas podrían tener mejores condiciones para replicarse. En segundo lugar, podría ocurrir que el polen polifloral usado para suplementar las colonias transmitiera virus infectivos (Singh *et al.*, 2010). La presencia de virus en el polen fue analizada, y se detectaron niveles muy bajos de ambos virus. Sin embargo, el hecho que i) las colmenas suplementadas no mostraron un aumento sostenido de los niveles de infección en el tiempo y ii) en todas las colmenas los niveles de infección aumentaron y disminuyeron en el tiempo independientemente de si recibieron o no suplementación, permite desestimar esta posibilidad. Más allá de esto, el hecho que las colmenas suplementadas presentaran mayor población de abejas adultas a pesar de tener mayores niveles de infección con virus, permite cuestionarnos cuáles son los efectos biológicos de estos virus sobre la abeja melífera.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo se puede proponer que la suplementación con polen polifloral en colmenas que son sometidas a estrés nutricional tiene efectos positivos en la colmena. La misma contribuyó a disminuir los niveles de infección con *Nosema spp.* y a mejorar la fortaleza de la colmena (población de abejas adultas). A pesar de que las colmenas suplementadas tuvieron mayores niveles de infección con los virus ABPV y DWV, estos virus no tuvieron mayor incidencia en la fortaleza de la colmena. Por lo tanto se confirma la hipótesis del trabajo, la cual plantea que la suplementación con polen polifloral de abejas *Apis mellifera* sometidas a estrés nutricional influye en la susceptibilidad de las mismas frente a la infección con patógenos.



6.1 Conclusiones

La suplementación con polen polifloral en colmenas sometidas a estrés nutricional y naturalmente infectadas con *N. ceranae*, ABPV y DWV:

- disminuyó los niveles de infección con el microsporidio *N.ceranae*.
- aumentó los niveles de infección de los virus ABPV y DWV.
- aumentó la población de abejas adultas.

La infección con *Nosema spp.* se asoció negativamente con la población de abejas adultas.

6.2 Perspectivas

A partir de los resultados del presente trabajo, se plantean nuevas perspectivas:

- Estudiar el efecto de la suplementación con polen polifloral en el sistema inmune y fisiología de abejas sometidas a estrés nutricional en plantaciones de *E. grandis*.
- Determinar aquellos componentes de la torta de polen polifloral que benefician en mayor medida las colmenas sometidas a estrés nutricional en estos ambientes.
- Estudiar la relación entre las infecciones virales y la nutrición de las abejas, y las consecuencias biológicas de esta interacción



- Abrol, D. P. 2012. Pollination Biology, Biodiversity Conservation and Agricultural Production. Ed Springer Netherlands. DOI: 10.1007/978-94-007-1942-2.
- Alaux, C.; Ducloz, F.; Crauser, D.; Le Conte, Y. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562–5.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Alaux, C.; Dantec, C; Parrinello, H; Le Conte, Y. 2011. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*. 12,496.
- Allen, M.; Ball, B, V. 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses, *Bee World* 77, 141-162.
- Ament, S.; Corona, M.; Pollok, H.; Robinson, G. 2008. Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *PNAS*. 105,4226–4231.
- Anderson, D.; Gibbs, A. 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of honey bee (*Apis mellifera Linnaeus*) in Australia. *J. Gen. Virol.* 69: 1617–1625.
- Anido, M. 2013. Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Uruguay.
- Antúnez, K.; Anido, M.; Branchiccela, B.; Harriet, J.; Campa, J.; Invernizzi, C.; Santos, E.; Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Zunino, P. 2015. Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Invertebrate Microbiology*.
- Antúnez, K.; Mendoza, Y.; Santos, E.; Invernizzi, C. 2013a. Differential expression of vitellogenin in honeybees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apiculture Research*. Vol 52 (227-234)

- Antúnez, K.; Anido, M.; Branchiccela, B.; Harriet, J.; Campá, J.; Martín-Hernández, R.; Higes, M.; Zunino, P. 2013b. Despoblación de colmenas. Proyecto FPTA-258 Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. Serie FPTA-INIA
- Antúnez, K.; Anido, M.; Garrido-Bailón, E.; Botías, C.; Zunino, P.; Martínez-Salvador, A.; Martín-Hernández, R.; Higes, M. 2012. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Research in Veterinary Science*. 93: 1441–1445.
- Antúnez, K.; Martín-Hernández, R.; Prieto, L.; Meana, A.; Zunino, P.; Higes, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae*. (*Microsporidia*). *Environ. Microbiol.* 11, 2284-2290.
- Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Corbella, E.; Ramallo, G.; & Zunino, P. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.009>
- Antúnez K.; D' Alessandro B.; Corbella E.; Zunino P. 2005. Detection of Chronic bee paralysis virus and Acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 90: 69–72.
- Antúnez K.; D' Alessandro B.; Piccini C., Corbella E.; Zunino P. 2004. *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a national survey. *J. Invert. Pathol.* 86: 56-58.
- Bacandritsos, N.; Granato, A.; Budge, G.; Papanastasiou, I.; Roinioti, E.; Caldon, M. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J Invertebr Pathol* 105: 335–340.
- Bailey, L.; Ball, B. V. 1991. *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London, UK. 193 pp.
- Bailey, L.; Carpenter, J.; Woods, D. 1978. Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. *J. Gen. Virol.* 43: 641-647.
- Bailey, L. 1965. Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J.*

Invertebr. Pathol. 7, 132-140

Baker A.; Schroeder S, A. 2008. Occurrence and genetic analysis of picorna-loke viruses infecting worker bees of the Detection of *Paenibacillus larvae* in Honey samples: Comparison with Isolation and Biochemical Characterization. Appl. Env. Microbiol. 69; 1505-1510.

Bakonyi, T.; Farkas, R.; Szendroi, A.; Dobos-Kovacs, M.; Rusvai, M. 2002. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. Apidologie. 33: 63-74.

Ball, B. V.; Allen, M. F. 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. Ann.Appl. Biol. 113, 237-244

Becandristos, N.; Granato, A.; Budge, G.; Papanastasiou, I; Roinioti, E.; Caldon, M.; Falcaro, C.; Gallina, A.; Mutinelli, F. 2010. Sudden death and colony population decline in Greek honey bee colonies. J. Invertebr. Pathol. 105, 335-340.

Berenyi, O.; Bakonyi, T.; Derakhshifar, I.; Koglbberger, H.; Topolska, G. 2007. Phylogenetic Analysis of Deformed Wing Virus Genotypes from Diverse Geographic Origins Indicates Recent Global Distribution of the Virus. Appl. Env. Microbiol. 73:3605-3611.

Bernal, J.; Martín-Hernandez, R.; Diego, J. C.; Nozal, M.J.;González-Porto, A. V.; Bernal, J. L.; Higes, M. 2011. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. Pest Manag Sci 67: 1320–1331

Boecking, O.; Genersch, E. 2008. Varroosis - the Ongoing Crisis in Bee Keeping. J. Verbr. Lebensm. 3: 221-228.

Borneck, R.; Viry, A.; Martín-Hernández, R.; Higes, M. 2010. Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. J Apic Res 49: 334–336.

- Botías, C.; Martín-Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.; González- Porto, A.;
Martínez-Salvador, A.; De La Rúa, P.; Meana, A.; Higes M. 2012. Res. Vet.
Science. 93, 150-155.
- Bourgeois, A.; Rinderer, T.; Beaman, L.; Danka, R. 2010. Genetic detection and
quantification of *Nosema apis* y *Nosema ceranae* in the honey bee. J,
Invertebr. Pathol. 103, 53-58.
- Branchiccela, B.; Arredondo, D.; Higes, M.; Invernizzi, C.; Martín-Hernández,
R.; Tomasco, I.; Zunino, P.; Antúnez, K. 2017. Characterization of *Nosema*
Ceranae Genetic Variants from Different Geographic Origins. Microbial
Ecology. Vol 73, 978-987.
- Brodtschneider, R.; Crailsheim, K. 2010. Nutrition and health in honey bees * -
Review article. Apidologie, 41(3), 278–294.
<https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time PCR: Trends and
problems. Journal of Molecular Endocrinology, 29(1), 23–39.
<https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>
- Cali, A.; Takvorian, P. M.; Lewin, S.; Rendel, M.; Sian, C.; Wittner, M.; Weiss,
L. M. 1996. Identificación de un nuevo microsporidio de
tipo *Nosema* asociado con miositis en un paciente con SIDA. J Eukaryot
Microbiol. 43 : 108S.
- Canning, E. U. Microsporidia. En: Kreier JP, Baker JR, editores. Protozoos
parásitos 2nd ed. Vol. 6. Nueva York, NY: Academic Press, Inc .; 1993. pp.
299-385
- Castelli, L.; Garrido, M.; Porrini, M.; Eguaras, M.; Santos, E.; Invernizzi, C.;
Zunino, P.; Antúnez, K. 2016. Efecto de la nutrición y la comunidad
microbiana intestinal de abejas melíferas sanas. XI Encuentro Nacional de
Microbiólogos. Uruguay.
- Chaimanee, V.; Chantawannakul, P.; Chen, Y.P.; Evans, J.D.; Pettis, J.S. 2012.
Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*)
after inoculated by *Nosema ceranae*. J. Insect. Physiol. doi:

10.1016/j.jinsphys.2012.04.016

- Chantawannakul, P.; Ward, L.; Boonham, N.; Brown, M. 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J. Invertebr. Pathol.* 91: 69-73.
- Chauzat, M. P.; Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Meana, A.; Cougoule, N.; Faucon, J. P. 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *J. Api. Res.* 46: 127-128.
- Chemurot, M.; De Smet, L.; Brunain, M.; De Rycke, R.; de Graaf, D. C. *Nosema neumanni* n.sp. (*Microsporidia*, *Nosematidae*), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2017.07.002>
- Chen, Y.; Evans, J.; Zhou, L.; Boncristiani, H.; Kimura, K.; Xiao, T.; Litkowski, A, M.; Pettis, J. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 204-209.
- Chen, Y.; Evans, J. D.; Smith, I. B.; Pettis, J. S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(2), 186–188. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.010>
- Chen, Y. P.; Siede, R. 2007. Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research*, 70(7), 33–80. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7)
- Chen, Y. P.; Evans, J. D.; Feldlaufer, M. 2006a. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 152–159.
- Chen, Y. P.; Pettis, J. S.; Collins, A.; Feldlaufer, M. F. 2006b. Prevalence and transmission of honey bee viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 606–611.
- Chen, Y. P.; Pettis, J. S.; Evans, J. D.; Kramer, M.; Feldlaufer, M. F. 2004. Molecular evidence for transmission of Kashmir bee virus in honey bee colonies by ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie.* 35: 441-448.

- Chioveanu, G.; Ionescu, D.; Mardare, A. 2004. Control of nosemosis-treatment with protofil. *Apiacta* 39, 31-38.
- Cox-Foster, D. L.; Conlan, S.; Holmes, E. C.; Palacios, G.; Evans, J. D.; Moran, N. A.; Quan, P. L.; Briese, T.; Hornig, M.; Geiser, D. M.; Martinson, V.; vanEngelsdorp, D.; Kalkstein, A. L.; Drysdale, A.; Hui, J.; Zhai, J.; Cui, L.; Hutchison, S. K.; Simons, J. F.; Egholm, M.; Pettis, J. S.; Lipkin, W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318: 283-287.
- Crane, E.; Graham, A. J. 2015. Bee Hives of the Ancient World. 1. *Bee World*. 66, 23–41.
- Dainat, B.; Evans, J. D.; Chen, Y. P.; Gauthier, L.; Neumann, P. 2012a. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE* 7: e32151.
- Dainat, B.; vanEngelsdorp, D.; Neumann, P. 2012b. Colony collapse disorder in Europe. *Environ Microbiol Rep* 4: 123–121.
- Davison, S.; leat, N.; Benjeddou, M. 2003. Development of molecular tools for honeybee virus research: the South African contribution. *African Journ. Of Biotech*. 2: 698-713.
- DEFRA Department for Environment Food and Rural Affairs, 2007. Foulbrood disease of honey bees recognition and control. www.defra.gov.uk/hort/Bees/pdf/foulbrood.pdf.
- de Groot, A. 1953. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica L.*). *Physiol Comp Oecol*. 3: 197-285.
- DeGrandi-Hoffman, G.; Chen, Y.; Huang, E.; Huang, M. H. 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera L.*). *Journal of Insect Physiology*, 56(9), 1184–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.017>
- de Miranda, J.; Genersch, E. 2010. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: S48–S61.

- de Miranda, J.; Cordoni, G.; Budge, G. 2010. The Acute bee paralysis virus– Kashmir bee virus Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: S30–S47.
- Deplane, K.; Van Der Steen, J.; Guzman, E. 2013. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research* 52 (1).
- DIEA. 2016. Anuario estadístico agropecuario. MGAP.
- Dietemann, V.; D.Ellis, J.; Neumann, P. *Coloss BeeBook. Volume I: Standard Methods for Apis mellifera research*. UK. IBRA.
- Di Pasquale, G.; Salignon, M.; Le Conte, Y.; Belzunces, L.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A.; Suchail, S.; Brunet, J.; Alaux, C. 2013. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS One*. 8,1–13.
- Donkersley, P.; Rhodes, G.; Pickup, R. W.; Jones, K. C.; Wilson, K. 2014. Honeybee nutrition is linked to landscape composition. *Ecology and Evolution*. 2014;4:4195–4206.
- Dussaubat, C.; Brunet, J. L.; Higes, M.; Colbourne, J. K.; Lopez, J.; Choi, J. H.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Cousin, M.; McDonnell, C.; Bonnet, M.; Belzunces, L. P.; Moritz, R.; Le Conte, Y.; Alaux, C. 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One*. 7.
- Ellis, J. D.; Evans, J. D.; Pettis, J. 2010. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 134–136.
<https://doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.30>
- Ellis J. D.; Munn P, A. 2005. The worldwide health status of honey bees, *Bee World* 86, 88-101.
- Evans, J, D.; Schwarz, R, S. 2011. Bee brought to their knees: microbes

- affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19, 614-620
- Fenoy, S.; Rueda, C.; Higes, M.; Martin-Hernández, R.; Aguiula, C. 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6886-6888.
- Fontbonne, R.; Garnery, L.; Vidau, C.; Aufauvre, J.; Texier, C.; Tchamitchian, S.; ElAlaoui, H.; Brunet, J.; Delbac, F.; Biron, D. 2013. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol 17. 188-194.
- Forsgren, E.; Fries, I., 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* 170: 212-217.
- Franzen, C.; Müller, A. 1999. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of *Microsporidia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 243–285
- Fries. 2015. *Nosema Apis* —A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World.* 74,5–19.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103, S73-S79.
- Fries, I.; Forsgren, E. 2009. *Nosema ceranae* fungerar inte som *Nosema apis*. *Nosema ceranae* does not function as *Nosema apis*. *Bitidningen* 107, juni, pp. 20-21.
- Fries, I. 1997. Protozoa. In: Morse, R.A. (Ed.), *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, 3rd ed. A. I. Root Company, Medina, Ohio, USA, pp. 57-76.
- Fries, I.; Feng, F.; Da Silva.; Slemenda, S. B.; Pieniasek, N. J. 1996. *Nosema ceranae n. sp.* (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *E. Journal of Protist.* 32, 356-365.
- Fries, I. 1993. *Nosema apis* a parasite in honey bee colony. *Bee World* 74, 5-

19.

- Gallai, N.; Salles, J. M.; Settele, J.; Vaissière, B. E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810–821.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Genersch, E. 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 103 (S1): S10-S19.
- Genersch, E.; Von der Ohe, W.; Kaatz, H.; Schroeder, A.; Otten, C.; Büchler, R.; Berg, S.; Ritter, W.; Mühlen, W.; Gisder, S.; Meixner, M.; Liebig, G.; Rosenkranz, P. 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41: 332-352.
- Genersch, E.; Forsgren, E.; Pentikäinen, J.; Ashiralieva, A.; Rauch, S.; Kilwinski, J.; Fries, I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbio.* 56: 501-11.
- Gisder, S.; Hedtke, K.; Möckel, N.; Frielitz, M. C.; Linde, A.; Genersch, E. 2010. Fiveyear cohort study of *Nosema spp.* in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3032-3038.
- Hansen H.; Brodsgaard C. J. 1999. American foulbrood: a review of its biology diagnosis and control. *Bee world.* 80: 5-23.
- Hatjina, F.; Tsoktouridis, G.; Bouga, M.; Charistos, L.; Evangelou, V.; Avtzis, D.; Meeus, I.; Brunain, M.; Smaghe, G.; de Graaf, D. C. 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *J Invertebr Pathol* 108: 131–134.
- Hedtke, K.; Jensen, P. M.; Jensen, A. B.; Genersch, E. 2011. Evidence for emerging parasites and pathogens *N. ceranae* an emergent pathogen for beekeeping. *Journal of Invertebrate Pathology.* V 108, 167-173.

- Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Higes, M.; Meana, A.; Bartolomé, C.; Botías, C.; Martín-Hernández, R. 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29.
- Higes, M.; Nozal, M. J.; Alvaro, A.; Barrios, L.; Meana, A.; Martín-Hernández, R.; Bernal, J. L.; Bernal, J. 2011. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*, 42: 364 - 377.
- Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Meana, A. 2010a. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41, 375–392. <https://doi.org/10.1051/apido/2010019>
- Higes, M.; Palencia, P. G.; Botías, C.; Meana, A.; Martín-Hernández, R. 2010b. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environ. Microbiol. Reports*. 2: 745-748.
- Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.; González-Porto, A. V.; García-Palencia, P.; Meana, A.; Bernal, J. L. 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x>
- Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Bailón, E. G.; González-Porto, A. V.; Barrios, L.; Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>
- Higes, M.; Garcia-Palencia, P.; Martin-Hernandez, R.; Meana, A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94: 211-217
- Higes, M.; Martín, R.; Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian

- parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(2), 93–95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>
- Highfield, A.; Nagar, A.; Mackinder, M.; Noe, L.; Hall, M.; Martin, S.; Schroeder, D. 2009. Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *Appl. Env. Microbiol.* 75: 7212-7220.
- Hornitzky, M. 2008. Nosema Disease. RIRDC Publication No 08/006. RIRDC Project No DAN228a
- Huang, W. 2012. Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terr.Arthropod.Rev.* 5,175–189.
- Huang, W., Jiang, J., Chen, Y., Wang, C., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie.* 38: 30–37.
- Hung, A.C.F.; Ball, B. V.; Adams, J. R.; Shimanuki, H.; Knox, D.A. 1996. A scientific note on the detection of American strains of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in dead bees in one US honeybee (*Apis mellifera*L.) colony. *Apidologie* 27, 55-56
- Invernizzi, C.; Abud, C.; Tomasco, I. H.; Harriet, J.; Ramallo, G.; Campá, J.;Katz, H.; Gardiol, G.; Mendoza, Y. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.006>
- Johnson, R. M.; Evans, J. D.; Robinson, G. E.; Berenbaum, M. R. 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *PNAS.* 106: 14790-14795.
- Klee, J.; Besana, A. M.; Genersh, E.; Gisder, S.; Nanetti, A.; Tam, D. Q.; Chinh, T. X.; Puerta, F.; Ruz, J. M.; Kryger, P.; Message, D.; Hatijana, F.; Korpela, S.; Fries, I.; Paxton, R. J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 1-10.
- Klein, A. M.; Vaissiere, B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.; Kremen, C.; Tschamtkke, T. 2007. Importance of pollinators in changing

- landscapes for world crops. *Proc.Biol.Sci.* 274,303–13.
- Kukielka, D.; Esperón, F.; Higes, M.; Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2008. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Virology Methods.* 147: 275-281.
- Lanzi G.; de Miranda J. R.; Boniotti M. B.; Cameron C. E.; Lavazza A.; Capucci L.; Camazines S. M.; Rossi C. 2006. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera*). *J. Virol.* 80:4998-5009.
- Lee,M. A.; Squirrell,D. J.; Leslie,D. L.; Brown,T. 2004. HomogeneousFluorescent Chemistries. In:Real-Time PCR; An Essential Guide
- Li, P.; Yin, Y. L.; Li, D.; Kim, S. W.; Wu, G. Y. 2007. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 237–252.
<https://doi.org/S000711450769936X> [pii] 10.1017/S000711450769936X
- Maggi et al. 2016. Honeybee health in South America. *Apidologie*. En prensa
- Martin, S. J.; Highfield, A. C.; Brettell, L.; Villalobos, E. M.; Budge, G. E.; Powell, M.;Nikaido, S.; Schroeder, D. C. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science.* 336: 1304-1306.
- Martínez, J.; Leal, G.; Conget, P. 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol Res.* 111, 601-607.
- Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Barrios, L.; Martínez-Salvador, A.; Meana, A.; Mayack, C.; Higes, M. 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*, 109(3), 605–612.
<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2292-9>
- Martín-Hernández, R.; Meana, A.; García-Palencia, P.; Marín, P.; Botías, C.; GarridoBailón, E.; Barrios, L.; Higes, M. 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honey bee microsporidia. *Appl Environ Microbiol.*75:

- Martín-Hernandez, R.; Meana, A.; Prieto, L.; Martínez- Salvador, A.; Garrido-Bailón, E.; Higes, M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,6331–6338.
- McGregor, S. E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. *Agricultural Handbook*, U.S. Dept. Agric. No. 46.
- Medici, S. K.; Sarlo, E. G.; Porrini, M. P.; Braunstein, M.; Eguaras, M. J. 2012. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitol. Res.* 110: 859-864.
- Mendoza, Y.; Díaz, J.; Ramallo, G.; Santos, E.; Porrini, M.; Invernizzi, C. 2016. *Nosema ceranae* Winter Control: Study of the Effectiveness of Different Fumagillin Treatments and Consequences on the Strength of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of Economic Entomology*, 2016, 1–5
- Mendoza, Y.; Díaz, J.; Ramallo, G.; Invernizzi, C. 2012. Incidencia de *Nosema ceranae* durante el invierno en colonias de abejas melíferas retiradas de una forestación de *Eucalyptus grandis*. *Veterinaria*, 48(188), 1–49.
Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4197235>
- MGAP. 2013. Anuario estadístico. <http://www.mgap.gub.uy>
- Morais, M.; Moreira, L.; Feás, X.; Estevinho, L. M. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(5), 1096–1101.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.020>
- Morse, R. A.; Calderone, N. K. 2000. The value of honey bee pollination the United States. *Bee Culture* 128.
- Morse, R. A.; Flottum, K. 1997. *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. A. I. Root Co, Medina, Ohio. P. 718.
- Nanetti, A. 2009. ApiHerb as an alternative product to treat *Nosema* infection.

- Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standarization” (COST Action FA0803) Guadalajara, www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online (accessed on 20 Nov. 2009).
- Naug, D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, 142(10), 2369–2372. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.007>
- Neumann, P.; Carreck, N. 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1–6. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>
- Oldroyd, B. P. 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biol* 5, 168.
- Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X.; Estevinho, L. M. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>
- Paxton, R., 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *J. Apicult. Res.* 49: 80-84.
- Paxton, R. J.; Klee, J.; Korpela, S.; Fires, I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Eurpe since at least 1998 and may be more virulent tan *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558-565.
- Pelin, A.; Selman, M.; Aris-Brosou, S.; Farinelli, L.; Corradi, N. Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *Nosema ceranae*. *Enviromental microbiology*. Vol 17, 4443-4458.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-timeRT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002-07.
- Pickard, R. S.; El-Shemy, A. A. M. 1989. Seasonal variation in the infection of honeybee colonies with *Nosema apis* Zander. *J. Apicul. Res.* 28, 93-100.
- Porrini, M. P.; Sarlo, E. G.; Medici, S. K.; Garrido, P. M.; Porrini, D. P.; Damiani, N.; Eguaras, M. J. 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *J Apic Res* 50:35-41.

- Potts, S. G.; Roberts, S. P. M.; Dean, R.; Marris, G.; Brown, M. A.; Jones, R., Neumann, P.; Settele, J. 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 15–22.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>
- Rennich, K.; Pettis, J.; vanEngelsdorp, D.; Bozarth, R.; Eversole, H.; Roccasecca, K.; Smith, M.; Stitzinger, J.; Andree, M.; Snyder, R.; Rice, N.; Evans, J.; Levi, V.; Lopez, D.; Rose, R.; 2011. National Honey Bee Pests and Diseases Survey report.
http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/honey_bees/downloads/2011_National_Survey_Report.pdf
- Rennich, K.; Pettis, J.; vanEngelsdorp, D.; Hayes, J.; Andre, M.; Snyder, R.; Roccasecca, K.; Rice, N.; Evans, J.; Lopez, D.; Levi, V.; Smith, M.; Patel, N.; Rose, R.; 2012. National Honey Bee Pests and Diseases Survey Report.
http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/honey_bees/downloads/2010-2011-Limited_Survey_Report.pdf
- Ribièrè, M.; Olivier, V.; Blanchard, P. 2010. Chronic bee paralysis: A disease and virus like no other? *J. Invertebr. Pathol.* 103: S120-S131.
- Ribièrè, M.; Lallemand, P.; Iscache, A.L.; Schurr, F.; Celle, O.; Blanchard, P.; Olivier, V.; Faucon, J.P. 2007. Spread of infectious Chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7711-7716.
- Rinderer, T. E.; Dell Elliott, K. 1977. Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: influence of diet. *J Econ Entomol.* 70:431-433.
- Rinderer, T. E.; Rothenbuhler, W. C.; Gochnauer, T. A. 1974. The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 23,347–350.
- Ririe, K.M.; Rasmussen, R.P.; Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain

reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160

Romero, R. 2007. *Microbiología y parasitología humana*. Argentina. Editorial Medica Panamericana S.A.

Rodríguez, M.; Vargas, M.; Gerding, M.; Navarro, H.; Antúnez, K. 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *Journal of Apicultural Research*. 51: 285-287.

Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103: S80-S95.

Sarlo, E.; Medici, S.K.; Braunstein, M.; Eguaras, M. 2008. Presencia y distribución de *Nosema ceranae* en la región sudeste de la Provincia de Buenos Aires. In: *Actas del Segundo Congreso Argentino de Apicultura*, Mar del Plata, Argentina, Agosto 2008, p.26.

Shen, M.; Cui, L.; Ostiguy, N.; Cox-Foster, D., 2005. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic *varroa* mite. *J. Gen. Virol.* 86: 2281-2289

Schmehl, D., Teal, P., Frazier, J., Grozinger, C. (2014) Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect. Physiol.*

Shimanuki, H.; Calderone, N.W.; Knox, D. A. 1994. Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am. Bee J.* 134: 117-119.

Singh, R.; Levitt, A. L.; Rajotte, E. G.; Holmes, E. C.; Ostiguy, N.; vanEngelsdorp, D.; Lipkin, W. I.; dePamphilis, C. W.; Toth, A, L.; Cox-Foster, D. L. 2010. RNA Viruses in Hymenopteran Pollinators: Evidence of Inter-Taxa Virus Transmission via Pollen and Potential Impact on Non-*Apis* Hymenopteran Species. *PLoS ONE* 5(12): e14357.
doi:10.1371/journal.pone.0014357

Somerville, D. 2001. Nutritional value of bee collected pollens. RIRDC publication 01/047, Rural Industries Research and Development

Corporation, Kingston, Australia.

Soroker, V.; Hertzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y.; Efrat, H.; Levski, S.; Kamer, Y.; Klinberg, E.; Zioni, N.; Inbar, S.; Chejanovsky, N. 2011. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*42: 192–199.

Stevanovic, J.; Stanimirovic, Z.; Genersch, E.; Kovacevic, S. R.; Ljubenkovic, J.; Radakovic, M.; Aleksic, N. 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42: 49–58.

Stokstad, E. 2007. Genomics. Puzzling declines of U.S. bees linked to virus from Australia. *Science* 317, 1204-1305.

Tentcheva, D.; Gauthier, L.; Jouve, S.; Canabady-Rochelle, L.; Dainat, B.; Cousserants, F.; Colin, M. E.; Ball, B. V.; Bergoin, M. 2004a. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* 35:431–439.

Tentcheva, D.; Gauthier, L.; Zappulla, N.; Dainat, B.; Cousserans, F.; Colin, M. E.; Bergoin, M. 2004b. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7185–7191.

Texier, C.; Vidau, C.; Vignes, B.; El Alaoui, H.; Delbac, F. 2010. Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr. Op. Micro.* 13:443–449

Thompson, G. J.; Yockey, H.; Lim, J.; Oldroyd, B. P. 2007. Experimental manipulation of ovary activation and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers: testing hypotheses of reproductive regulation. *J Exp Zool.* 307A: 600–610. [PubMed]

Tortora, G.; Funke, B.; Case, C. 2007. Libro introducción a la microbiología. Argentina. Editoria Medica Panamericana S.A.

Traver, B.E., and Fell, R.D. 2011. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J Invertebr Pathol* 107:

43–49.

Unep. 2011. Unep Emerging Issues: Global Honey Bee Colony Disorders and Other Threats To Insect. Agriculture, 16.

vanDooremalen, C.; Gerritsen, L.; Cornelissen, B.; van der Steen, J.J.; van Langevelde, F.; Blacquièrre, T. 2012. Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. PLoS One, 7(4), e36285.

vanEngelsdorp, D.; Meixner, M. D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. Journal of Invertebrate Pathology, 103(SUPPL. 1), S80–S95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>

VanEngelsdorp, D.; Evans, J.; Saegerman, C.; Mullin, C.; Haubruge, E.; Nguyen, B.; Frazier, M.; Frazier, J.; Cox-Foster, D.; Chen, Y.; Underwood, R.; Tarry, D.; Pettis, J. 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study.

VanEngelsdorp, D.; Hayes, J.; Underwood, R.; Pettis, J. 2008. A Survey of honey bee colony losses in the U.S.

Vossbrinck CR, Woese C R. Los ribosomas eucarióticos que carecen de un ARN 5.8S. Naturaleza. 1986; 320 : 287-288

Vossbrinck, C. R.; Maddox, J. V.; Friedman, S.; Debrunner-Vossbrinck, B. A.; Woese, C. R. La secuencia de ARN ribosomal sugiere que los microsporidios son extremadamente antiguos eucariotas. Naturaleza. 1987; 326 : 411-414.

Wahl, O.; Ulm, K. 1983. Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. Oecologia. 59,106–28.

Walker, N.J. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. Science 296: 557-559.

Williams, G. R.; Dietemann, V.; Ellis, D.; Neumann, P. 2012. An update on the COLOSS network and the BEEBOOK: standard methodologies for Apis

mellifera research. J. Apic. Res. 51: 151–153.

Williams, G. R.; Shutler, D.; Little, C. M.; Burger-Maclellan, K. L.; Rogers, R. L. E. 2011. The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagillin-B, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie*, 42: 15-22. [Links]

Williams, G. R.; Sampson, M. A.; Shutler, D.; Rogers, R. E. L. 2008. Does fumagillin control the recently-detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology*, 99: 342-44.

Yang, X.; Cox-Foster, D. 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* .134, 405–412.

Yang, X.; Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 102: 7470-5.

Yue, C.; Schröder, M.; Gisder, S.; Genersch, E. 2007. Vertical transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol.* 88, 2329–2336.

Yue, C.; Genersch, E. 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86: 3419-3424.

Zander, E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Munchener Bienenzeitung* 31, 196-204.