

Nosema ceranae en los abejorros nativos *Bombus atratus* y *B. bellicosus*

Lic. Natalia Arbulo
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA
Área Biología, Sub-área Zoología

Orientadores:
Dr. Ciro Invernizzi
Sección Etología. Facultad de Ciencias, Udelar
Dra. Karina Antúnez
Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable

Tribunal: Dra. Claudia Piccini, Dra. Ivanna Tomasco y Dr. Martín Bolazzi

Montevideo, 2015

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es producto del trabajo, colaboración y apoyo de mucha gente. Quiero expresar un profundo agradecimiento a TODOS los que colaborando y acompañando hicieron posible este trabajo ya que de otro modo no lo hubiese logrado.

A Ciro Invernizzi, responsable o culpable de todo este trabajo. Gracias por orientarme desde hace más de 10 años en las distintas etapas de mi carrera académica y por ser además compañero.

A Karina Antúnez por aceptar ser mi co-orientadora y haber soportado hasta el final con la mayor disponibilidad y buena onda siempre. Gracias por enseñarme además de las técnicas moleculares utilizadas, a trabajar en equipo de forma eficiente.

A Martín Bollazzi, Claudia Piccini e Ivanna Tomasco por aceptar ser parte del tribunal a pesar del poco tiempo con el que contaban para leer. Por sus valiosos aportes y por generar un ambiente distendido durante la defensa que me permitió disfrutar del momento.

A mi querida Tribu Bombini. A Estela por su ayuda invaluable en distintas tareas de la tesis pero sobre todo por el positivismo que le pone a las cosas y por transmitirnos la pasión que siente por lo que hace. A Sheena, mi compañera de ruta, mi amiga, por su apoyo y colaboración en las distintas etapas de la tesis y por haber hecho hoy realidad ideas y proyectos que desarrollamos juntas.

A la Unidad de Apoyo Académico de la Comisión Coordinadora del Interior de la Udelar por financiar mi pasantía en el Centro Apícola Regional de Marchamalo, España, donde realicé parte de los análisis de laboratorio.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por abrir las puertas de la Estación Experimental La Estanzuela a nuestro grupo de investigación y brindar sus instalaciones (cultivos, laboratorios, dormitorios), su apoyo técnico y mano de obra. A las personas que hicieron esto posible: Yamandú Mendoza, Rodrigo Zarza y Carlos Rossi.

A todos los que me ayudaron en la recolección de los más de 600 abejorros que utilicé para la tesis. Al personal de Apicultura de INIA-La Estanzuela: Yamandú, Gustavo, Sebastián y Máximo. A María Ruiz, Valeria Rodríguez y Alejandro Arbulo. A Bruno Invernizzi. A Bebe Castiglioni y Tabita Aramayo.

A todos quienes me ayudaron y enseñaron las distintas técnicas de laboratorio que permitieron los diversos análisis realizados. Al equipo del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) por recibirme y pacientemente enseñarme a trabajar en el laboratorio. Gracias especialmente a Matilde, Belén, Daniela y Loreley por la colaboración en distintas instancias de la tesis. A Mariano Higes y Raquel Martín-Hernández del Laboratorio de Patología Apícola del Centro Regional Apícola de Marchamalo (Guadalajara, España) por el asesoramiento y por el tiempo y los recursos invertidos en esta tesis. A todo su equipo de técnicos e investigadores. A los integrantes del Laboratorio de Ecología Química de Facultad de Química. A Andrés González y Carmen Rossini por el tiempo y recursos dedicados a la explicación de las técnicas, al procesamiento y análisis de los datos y a la revisión del capítulo 2 de esta tesis. A María Laura, Belén, Hernán, Paula y Valeria por la invaluable colaboración en las diferentes tareas realizadas en el laboratorio.

A todos aquellos que acompañando y apoyando desde distintos lugares y de diferentes maneras hicieron posible que hoy culmine.

Al "piso 6" de Facultad de Ciencias que a pesar de la distancia siempre soy recibida con la misma buena onda de la primera vez. Gracias a todos por el aguante en todo momento.

A mis compañeros en el CURE: Mercedes, Enrique, Javier, Camila, Laura, César, Joaquín, Tincho, Emilio, Tabita y Juan Pablo por el apoyo. Especialmente a Laura por ayudarme con las técnicas de microscopía. A Camila por acompañarme siempre, en las académicas y en las otras. A Joaquín por compartir discusiones casi filosóficas que ayudan a despejar las ideas. A Bebe, Tabita y Juan Pablo por bancar mis ausencias en proyectos conjuntos y por preocuparse diariamente de mis avances con la tesis.

A mi familia. A Pepe y a Ema que fueron los más afectados por el tiempo robado y las locuras de los momentos decisivos. A mis padres, María y Eduardo, quienes me enseñaron a amar lo que uno hace y me han acompañado y apoyado en todo. A mis hermanos Vito, Nacho y Ale que son el soporte fundamental de mi vida estando siempre. A mis amigas, Juana, Virginia y Natalia, quienes supieron entender ausencias y acompañar en todo momento.

Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Crisis global de polinizadores	3
2.2. Los abejorros del género <i>Bombus</i>	4
2.3. Los parásitos como amenaza a las poblaciones de ápidos	8
2.4. La eusocialidad y los parásitos	13
2.5. Principales parásitos y patógenos que afectan a los abejorros	15
2.6. Los microsporidios	17
2.7. Microsporidios del género <i>Nosema</i> en ápidos	18
2.8. Epidemiología y patogenicidad de <i>Nosema</i> sp en ápidos	21
2.8.1. <i>Nosema apis</i>	21
2.8.2. <i>Nosema bombi</i>	21
2.8.3. <i>Nosema ceranae</i>	24
3. Capítulo 1: Detección, cuantificación y prevalencia de <i>Nosema ceranae</i> en <i>Bombus atratus</i> y <i>Bombus bellicosus</i>	30
3.1. Introducción	30
3.2. Hipótesis	31
3.3. Objetivo general	32
3.4. Objetivos específicos	32
3.5. Materiales y métodos	33
3.5.1. Recolección de abejorros	33
3.5.2. Preparación de muestras	33
3.5.3. Identificación de la especie de <i>Nosema</i>	34
3.5.3.1. Extracción de ADN	34
3.5.3.2. Amplificación mediante PCR	35
3.5.3.3. Análisis de los datos	36
3.5.4. Conteo de esporas	36
3.5.5. Análisis de las células epiteliales del intestino de los abejorros	37
3.5.6. Análisis del gen que codifica para PTP1 de <i>N. ceranae</i>	38
3.6. Resultados	40
3.6.1. Identificación de las especies de <i>Nosema</i> presentes en abejorros nativos	40
3.6.2. Prevalencia de <i>N. ceranae</i> en abejorros nativos	42
3.6.3. Intensidad de infección de <i>N. ceranae</i> en abejorros nativos	43
3.6.4. Análisis de las células epiteliales del intestino de los abejorros	46
3.6.5. Análisis del gen que codifica para PTP1 de <i>N. ceranae</i>	47
3.7. Discusión	50
3.7.1. Prevalencia de <i>Nosema ceranae</i>	51
3.7.2. Intensidad de infección de <i>N. ceranae</i>	56
3.7.3. Diferencias interespecíficas en la interacción con <i>N. ceranae</i>	57
3.7.4. Diferencias entre sexos en la infección de <i>N. ceranae</i>	59
3.7.5. Análisis del gen que codifica para PTP1 de <i>N. ceranae</i>	63
4. Capítulo 2: Análisis de hidrocarburos cuticulares para discriminar abejorros <i>Bombus atratus</i> de diferentes colonias	69
4.1. Introducción	69
4.2. Hipótesis	71
4.3. Objetivo general	71
4.4. Objetivos específicos	71
4.5. Materiales y métodos	72

4.5.1. Preparación de las muestras	72
4.5.2. Análisis químicos	72
4.5.3. Procesamiento de los datos	73
4.5.4. Análisis de los datos	74
4.6. Resultados	77
4.6.1. Perfil de hidrocarburos cuticulares de <i>B. atratus</i>	77
4.6.2. Discriminación de colonias	79
4.6.3. Análisis de los extractos cuticulares de obreras recolectadas en el campo	82
4.7. Discusión	86
5. Consideraciones finales	91
6. Conclusiones y perspectivas	94
7. Referencias bibliográficas	95

1. RESUMEN

Existe una gran preocupación por la creciente pérdida de diversidad de polinizadores, especialmente de abejas melíferas y abejorros. El efecto de parásitos y patógenos es una de las causas propuestas para explicar este fenómeno. Los abejorros del género *Bombus* son insectos eusociales que presentan un ciclo anual y son hospederos de una gran variedad de parásitos y patógenos. El microsporidio *Nosema ceranae* es actualmente uno de los patógenos más prevalentes en *A. mellifera* en el mundo. Recientemente, ha sido encontrado también en otras especies de *Apis*, varias especies de abejorros y algunas abejas solitarias. En Uruguay, *N. ceranae* está ampliamente extendido en las abejas melíferas. El amplio rango de hospederos lo señalan como un patógeno altamente versátil que amenaza las comunidades de abejas. En un primer capítulo de la tesis se estudió la prevalencia y nivel de infección de *N. ceranae* en las dos especies nativas de abejorros *B. atratus* y *B. bellicosus*. Además, se analizaron las relaciones genéticas entre aislamientos del microsporidio provenientes de abejorros y de *A. mellifera*. A partir de macerados individuales del abdomen de los abejorros se realizaron análisis moleculares con *primers* específicos para *N. apis*, *N. bombi* y *N. ceranae*. También se determinó el número de esporas mediante microscopía óptica. *N. ceranae* fue el único microsporidio identificado, presentando una prevalencia mayor al 50%. Se encontraron diferencias en la prevalencia entre localidades, especies y sexos. En el nivel de infección, las diferencias más importantes se observaron entre sexos. Se discuten posibles explicaciones para los patrones observados que incluyen: susceptibilidad diferencial, efecto de la densidad de hospederos y diferencias comportamentales entre sexos que incidirían en la probabilidad de transmisión del patógeno. El análisis de las relaciones genéticas, sugiere que las poblaciones de *N. ceranae* circulando en abejorros y abejas melíferas son similares. En un segundo capítulo de la tesis se analiza el perfil de hidrocarburos cuticulares (HCC) de abejorros con el objetivo de poder estimar el número de colonias representadas en muestras de pecoreadoras recolectadas a campo y así poder analizar la incidencia de *N. ceranae* a nivel poblacional. Debido a limitaciones metodológicas no fue posible determinar el número de colonias representadas en la muestra de campo. Sin embargo, los

resultados sugerirían la presencia de más de una colonia. Teniendo en cuenta que los polinizadores comparten recursos florales que pueden ser foco de transmisión de patógenos y que *N. ceranae* tiene la habilidad de infectar distintas especies, la presencia de este patógeno sería una amenaza para toda la comunidad de polinizadores. Urge la necesidad de realizar estudios sobre la presencia, prevalencia y los efectos de *N. ceranae* en diferentes especies hospedadas. Esta información será insumo relevante para el desarrollo de políticas de protección de especies ecológica y económicamente importantes como son los polinizadores.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Crisis global de polinizadores

En la actualidad existe una gran preocupación entre científicos y técnicos de distintas partes del mundo por la creciente pérdida de diversidad (riqueza y/o abundancia) de polinizadores, especialmente de abejas melíferas (*Apis mellifera*) y abejorros (*Bombus*) (Hymenoptera, Apoidea, Apidae). En la última década ha sido alarmante la pérdida de colonias de abejas melíferas por causas que están siendo intensamente investigadas (Oldroyd 2007, Stokstad 2007, Van Engelsdorp *et al.* 2009, Potts *et al.* 2010, Neumann & Carreck 2010, Van Engelsdorp & Meixner 2010, Vanbergen *et al.* 2013).

La polinización es un proceso ecológico fundamental ya que es esencial para la reproducción de las plantas. El 90% de las plantas con flor necesitan de los animales para su polinización y la mayoría de los cultivos utilizados directa o indirectamente para la alimentación humana dependen de la polinización entomófila. Por tanto, los insectos polinizadores son esenciales para el mantenimiento de las comunidades vegetales y de la productividad de muchos sistemas agrícolas (Kearns *et al.* 1998, Klein *et al.* 2007; Potts *et al.* 2010).

El grupo de polinizadores por excelencia, responsables de la polinización de aproximadamente el 80% de las especies vegetales, lo constituyen las abejas pertenecientes a la superfamilia Apoidea (ej.: abejas melíferas, abejorros, abejas solitarias, abejas sin aguijón) de los himenópteros. A diferencia de otros grupos de polinizadores que participan de manera incidental en la polinización (mientras se alimentan del néctar o de alguna parte de la flor), las abejas participan activamente de este proceso. Al visitar un gran número de flores colectan deliberadamente polen y néctar para la alimentación de sus crías: larvas inmóviles cuya dieta está basada exclusivamente en estos dos recursos. Existen aproximadamente 20.000 especies de abejas, de las cuales solo un 3% aproximadamente son sociales, que contribuyen de manera importante a la polinización. Algunas de estas especies pueden ser más eficientes que las abejas melíferas, el integrante más conocido del grupo y el insecto más utilizado a nivel mundial para la polinización de cultivos.

En el contexto de la crisis global de polinización, se prevé que las pérdidas económicas por falta de polinización de cultivos serían millonarias. Un

estudio indica que en el año 2005 el valor económico generado por la polinización entomófila alcanzó a 215 billones de dólares (9,5% del valor total de la producción agrícola mundial de ese año) (Gallai *et al.* 2009). A nivel nacional se realizó un análisis del valor atribuible a la polinización entomófila para algunos cultivos hortícolas del país que incluyen Cucurbitáceas, Solanáceas, frutilla, melón, así como de semilleros de cebolla y zanahoria. Para la zafra 2012, ese valor se estimó en aproximadamente 3 millones y medio de dólares, siendo 2,7 millones el valor económico atribuible a la abeja melífera, dado que los cultivos dependen en diferente medida de ésta (Santos *et al.* 2014). Teniendo en cuenta que diversas especies de abejas pueden ser más eficientes que las abejas melíferas en la polinización de algunos cultivos y que además, el estudio está restringido a unas pocas especies vegetales, el valor total de la polinización entomófila para Uruguay es seguramente muy superior.

Las causas planteadas para explicar la disminución en la diversidad de polinizadores son variadas, complejas y posiblemente sinérgicas. Entre estas se destacan los cambios en el uso del suelo que llevan a la pérdida y fragmentación de hábitat, las prácticas agrícolas intensivas que incluyen el monocultivo y la utilización de grandes cantidades de agroquímicos, la introducción de especies exóticas y el efecto de los parásitos y patógenos (Kearns *et al.* 1998, Kremen *et al.* 2002, Goulson 2003a, b, 2010, Williams & Osborne 2009, Potts *et al.* 2010, Cameron *et al.* 2011, Vanbergen *et al.* 2013, Goulson *et al.* 2015)

2.2. Los abejorros del género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae)

El género *Bombus* está ampliamente distribuido en las regiones Holártica, Oriental y Neotropical del mundo, existiendo mayor abundancia y riqueza de especies en las zonas templadas de América del Norte y Eurasia (Cameron & Williams 2003). Para América del Sur están registradas 24 especies nativas (Abrahamovich & Díaz, 2002; Abrahamovich *et al.* 2005) y además están citadas dos especies europeas (*Bombus ruderatus* y *B. terrestris*) que fueron introducidas en Chile y se han extendido a algunas regiones de Argentina (Morales *et al.* 2013). Para Uruguay, han sido citadas cuatro especies nativas: *B. atratus*, *B. bellicosus*, *B. brasiliensis* y *B. morio*

(Abrahamovich & Díaz, 2002; Abrahamovich et al. 2005). Los únicos registros de las dos últimas especies son los mencionados por Abrahamovich y Díaz (2002) que son históricos y restringidos a una o unas pocas localidades del país. Desde el año 2005, en un exhaustivo trabajo de recolección e identificación de ejemplares provenientes de todo el país, Santos *et al.* (2013) han constatado que actualmente en Uruguay están presentes únicamente *B. atratus* y *B. bellicosus* (Figura 1). La primera de estas especies está ampliamente distribuida en el país mientras que la segunda parecería estar restringida al sur del Río Negro (Santos *et al.* 2013).



Figura 1 – Especies de abejorros encontradas en Uruguay. a) *Bombus atratus* en sus formas melánica (izquierda) y flavínica (derecha). b) *Bombus bellicosus*

Los abejorros del género *Bombus* son insectos primitivamente eusociales, que presentan un ciclo anual en el cual las jóvenes reinas fertilizadas emergen de la hibernación al comienzo de la temporada cálida y cada una funda una nueva colonia anidando generalmente en cavidades en o cerca de la superficie del suelo (aunque hay registro de nidos aéreos para algunas especies). En la etapa inicial de la colonia se producen sólo obreras y en la terminal se producen machos y nuevas reinas, cesando además la producción de obreras. En otoño la reina muere y a medida que lo hacen las obreras el nido va pereciendo finalizando así el ciclo de la colonia. Las jóvenes reinas, luego del apareamiento acumulan reservas y buscan un lugar resguardado y seco bajo tierra para hibernar. Los machos abandonan el nido al poco tiempo de haber emergido y luego del apareamiento mueren (Michener 1974, Goulson 2003, Heinrich 2004) (Figura 2). En Uruguay, desde setiembre a diciembre aproximadamente, pueden observarse reinas recién emergidas de su

hibernación forrajeando o buscando sitio de anidación. En los meses siguientes las colonias crecen hasta alcanzar un pico poblacional entre febrero y marzo. Luego la población comienza a disminuir y los nidos perecen en otoño, en algunos casos llegando incluso hasta comienzo del invierno. En general, en marzo ya se observan machos y nuevas reinas en vuelo. En ocasiones, estas reinas se comportan de manera similar a una obrera, involucrándose en tareas de aprovisionamiento del nido natal hasta el momento de la hibernación.

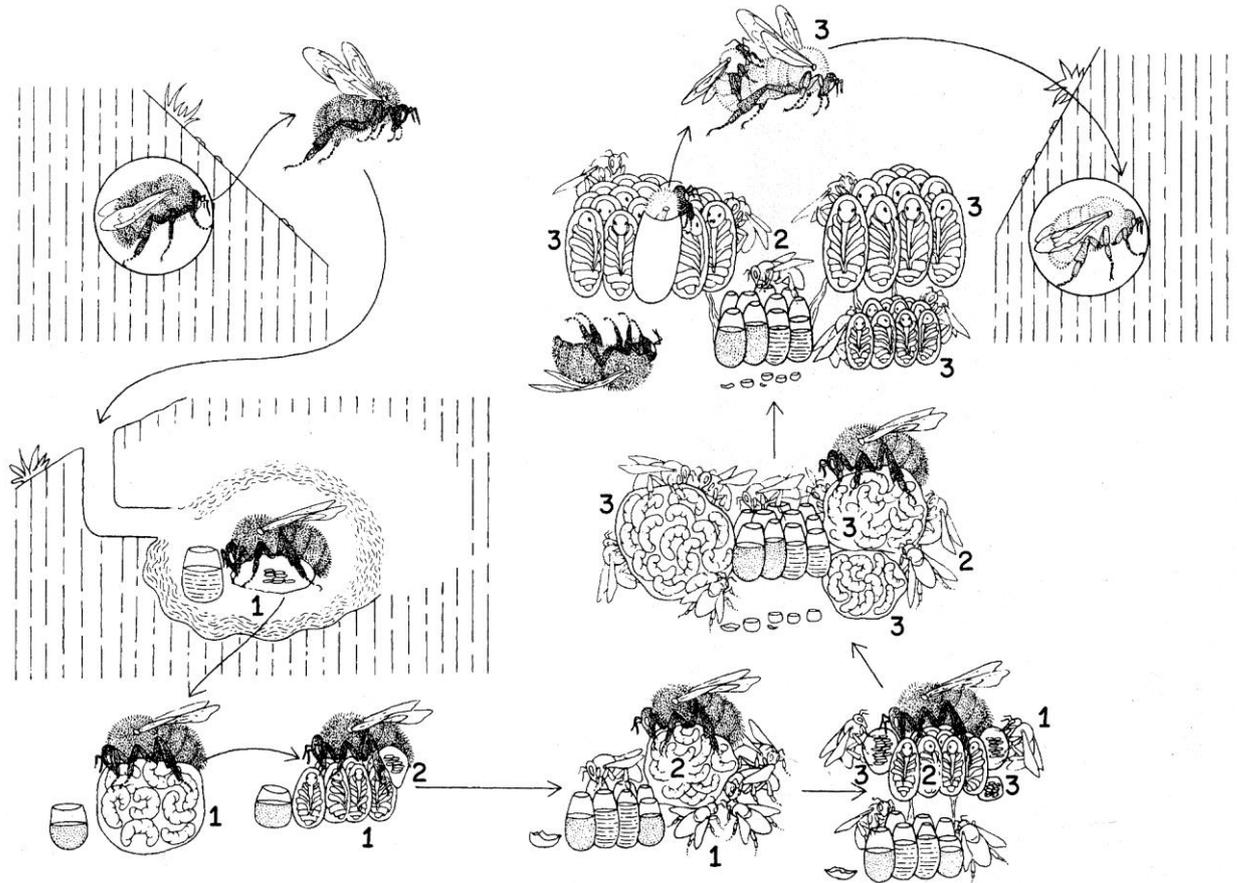


Figura 2 – Diagrama del ciclo de vida de los abejorros (*Bombus* sp.). Tomado de Heinrich 2004. La joven reina emerge de la hibernación y funda una colonia (izq.), en la etapa inicial se producen sólo obreras y en la terminal se producen machos y reinas las que luego del apareamiento buscan sitio para hibernar (der. arriba). Se puede observar la progresión de huevo a adulto de las camadas de cría. El diagrama incluye la producción de dos camadas de obreras (1 y 2) y una de reinas (3), esta última con tres conjuntos de huevos separados. Los capullos libres son utilizados para almacenamiento de néctar o polen.

Los abejorros son reconocidos mundialmente como excelentes polinizadores de una amplia variedad de especies vegetales incluyendo numerosos cultivos de interés comercial (Free 1993, Goulson 2003, Heinrich

2004). Por esta razón, en muchas regiones del mundo los abejorros son ecológica y económicamente importantes.

La utilización de abejorros como agentes polinizadores de cultivos ha adquirido gran importancia en la agricultura moderna ya que poseen características que los hacen en algunos casos más eficientes que las abejas melíferas (Velthuis 2002, Goulson 2003, Heinrich 2004, Velthuis y van Doorn 2006). Entre estos atributos se destaca que poseen cuerpos de mayor tamaño con pelos gruesos y numerosos que les permite remover gran cantidad de polen (Free 1993, Goulson 2003). Muchas especies poseen probóscides largas, que le permiten forrajear en flores con corolas tubulares profundas que no suelen ser polinizadas de manera eficiente por la abeja melífera (Free 1993, Goulson 2003, Heinrich 2004). Pueden trabajar a bajas temperaturas por lo que son importantes polinizadores en regiones frías y templadas (Free 1993, Goulson 2003, Heinrich 2004). Adicionalmente, bajo las mismas condiciones ambientales, los abejorros tienden a forrajear más rápido que las abejas melíferas y por lo tanto polinizan más flores por individuo (Free 1993) y también suelen forrajear más horas por día (Estay *et al.* 2001). Por último, son capaces de realizar “polinización por zumbido” al aferrarse de las anteras con sus mandíbulas y contraer los músculos de vuelo para sacudir la flor y desprender los granos de polen. Este fenómeno es requerido por las flores de la familia Solanaceae, algunas especies de Ericaceae y Boraginaceae y no puede ser llevado a cabo con éxito por la mayoría de las abejas (Free 1993).

En Uruguay ambas especies de abejorros utilizan un gran número de recursos florales entre los que se encuentran varios de interés productivo. Se destaca el trébol rojo (*Trifolium pratense*), una de las leguminosas forrajeras más utilizadas en el país y que presenta bajos rendimientos de semillas debido a limitaciones en la polinización (Salvarrey 2012). Resultados obtenidos por Salvarrey (2012) demuestran que el uso de los abejorros nativos para la polinización del trébol rojo aumenta considerablemente la cantidad de semillas producidas por inflorescencia. Adicionalmente, se han obtenido resultados exitosos en experiencias de polinización de tomate (*Solanum lycopersicum*) en invernáculos del sur del país (Estela Santos y Sheena Salvarrey com. pers). Las ventajas productivas obtenidas en el cultivo de tomate bajo invernáculo debido a la eficiencia de la polinización por parte de los abejorros, son la razón

principal por la cual se inició y se mantiene la producción artificial y comercialización de colonias de abejorros en el mundo (Velthuis y van Doorn 2006).

Las experiencias locales resaltan el potencial de las especies nativas como polinizadores de cultivos de interés comercial en el país. No obstante, la floración de muchos cultivos suele no coincidir con el pico poblacional de los abejorros. En este sentido, se han tenido grandes avances en la cría en condiciones controladas de colonias de ambas especies de abejorro (Salvarrey *et al.* 2013). Con esta tecnología, además de potencialmente poder brindar beneficios a distintos sectores productivos del país, se prescindiría de una posible introducción de las especies exóticas que actualmente son comercializadas en el mundo. Esto evitaría los riesgos que conlleva la introducción de nuevas especies, que incluyen: competencia con las especies nativas, hibridación con las especies nativas, mejora en la polinización de plantas no-nativas y diseminación de parásitos hacia las especies o poblaciones nativas (Goulson 2003a, b, 2010, Dafni *et al.* 2010, Morales *et al.* 2013), siendo esta última amenaza la más seria (Goulson & Hughes 2015).

2.3. Los parásitos como amenaza a las poblaciones de ápidos

La mayoría de los organismos, si no todos, son hospederos de algún parásito y en general albergan más de una especie. Los parásitos tienen un rol ecológico fundamental como reguladores de las poblaciones de sus hospederos. No obstante, hay circunstancias en las que las poblaciones de parásitos pueden tener consecuencias desmedidas sobre las poblaciones hospederos (Schmid-Hempel 2011).

En el marco del cambio global, caracterizado entre otras cosas por la intensificación agrícola, los efectos de los parásitos sobre las poblaciones hospederas podrían verse aumentados como consecuencia de la pérdida y fragmentación de hábitat, por el incremento en el uso de pesticidas o por el cambio climático (Potts *et al.* 2010). Además, los patógenos adquieren un rol relevante en el contexto actual de la globalización del transporte y el comercio ya que esto aumenta la probabilidad de la aparición de enfermedades emergentes que ponen en riesgo el bienestar humano y la biodiversidad (Daszak *et al.* 2000).

Una enfermedad es considerada emergente cuando es ocasionada por un patógeno nuevo, por un patógeno conocido en un nuevo hospedero o cuando un patógeno aumenta rápidamente su rango geográfico o su nivel de incidencia (Daszak *et al.* 2000). Los patógenos emergentes son de especial preocupación debido a que la ausencia de una historia evolutiva común con los nuevos hospederos implica la ausencia de evolución de restricciones en la susceptibilidad y la patogenicidad (Woolhouse *et al.* 2005). Los animales que son transportados e introducidos a distintas regiones geográficas con diferentes fines (alimentación, control de plagas, polinización, cría en cautiverio, planes de conservación, transporte accidental, etc.), son portadores de diversos patógenos que pueden encontrar hospederos susceptibles en las nuevas áreas, pudiendo provocar enfermedades emergentes con efectos impredecibles sobre las comunidades animales nativas y/o sobre las poblaciones locales de las especies domesticadas. Adicionalmente, el transporte de potenciales hospederos hacia una nueva área geográfica puede resultar también en enfermedades emergentes (Daszak *et al.* 2000).

Los ápidos (Hymenoptera, Apoidea, Apidae) son hospederos de un rango amplio de parásitos pertenecientes a diversos grupos de organismos. Los parásitos “naturales” indudablemente juegan un rol importante, aunque poco conocido, influenciando las dinámicas poblacionales de las diferentes especies de abejas. Sin embargo, la introducción de parásitos no-nativos tiene potencialmente efectos dramáticos sobre las poblaciones. Las abejas melíferas y los abejorros son los principales polinizadores manejados por el ser humano y son transportados intencionalmente a distintas regiones en el contexto de su comercialización. Las abejas melíferas, originarias de la región euroasiática, es criada por el ser humano desde hace siglos y ha sido introducida en casi todo el mundo siendo utilizada para la explotación de sus productos (miel, ceras, propóleos) y para la polinización de cultivos. Desde la década de 1980, colonias de unas pocas especies de abejorros, principalmente de *B. terrestris* de origen euroasiático y *B. impatiens* de origen norteamericano, son criadas y comercializadas para la polinización de cultivos. La comercialización de *B. terrestris* incluso ha expandido esta especie fuera de su rango geográfico natural, llegando a Japón, China, Chile y Nueva Zelanda (Velthuis & van Doorn 2006). Las condiciones de cría y mantenimiento de las colonias de abejas

melíferas y abejorros, caracterizadas por una alta densidad de colonias y gran disponibilidad de alimento, incrementa las chances de sobrevivencia y reproducción, facilitando la proliferación y transmisión de enfermedades (Murray *et al.* 2013).

La transmisión de enfermedades desde poblaciones con una alta carga de patógenos (“poblaciones reservorios”) como los animales domésticos, hacia poblaciones silvestres que no son reservorios, se conoce como “derrame de patógenos” (“*pathogen spillover*”) (Daszak *et al.* 2000). Las amenazas de este fenómeno son la posible introducción de nuevos patógenos o de cepas de patógenos adaptadas comercialmente, o que las especies comerciales actúen como reservorios de patógenos que lleven a aumentar la prevalencia de los mismos en poblaciones de especies silvestres (Stout & Morales 2009, Meeus *et al.* 2011).

Los saltos de hospedero (*host shifts*) y la existencia de patógenos con amplios rangos de hospedero son fenómenos bastante comunes (Woolhouse *et al.* 2005). El rango de hospederos de los parásitos es muy variable, existiendo un gradiente desde patógenos que naturalmente sólo infectan a una única especie hasta otros que pueden infectar diversos hospederos, incluso pertenecientes a órdenes o clases taxonómicas diferentes (Woolhouse *et al.* 2005, Schmid-Hempel 2011). Ese rango está determinado por una combinación de factores que pueden resumirse en la existencia de filtros ecológicos y fisiológicos que evolucionan por selección natural (Schmid-Hempel 2011). En general, los cambios de hospedero o la adaptación a un nuevo hospedero, se asocian a cambios genéticos que pueden ser muy rápidos y específicos (Schmid-Hempel 2011). Es cada vez mayor la evidencia de fenómenos de salto de hospedero en las abejas (Hymenoptera, Apoidea) principalmente entre distintas especies de abejas melíferas (*Apis* spp.) y abejorros.

La transferencia de parásitos y patógenos en las comunidades de abejas se ve facilitada por la cercanía filogenética y por la superposición de características ecológicas como el nicho o el rango geográfico (Manley *et al.* 2015). Una de las características que promovería esa transmisión es el hecho de que las diferentes especies de polinizadores comparten recursos florales y en las flores pueden haber estructuras de propagación de patógenos depositados por individuos infectados durante sus visitas (Durrer & Schmid-

Hempel 1995). En este sentido, Singh *et al.* (2010) encontraron evidencias de que varios virus se diseminan libremente entre diferentes especies de abejas (*A. mellifera*, varias especies de abejorros y de abejas solitarias) a través del polen de las flores que comparten durante el forrajeo. También demostraron en condiciones controladas que teniendo como único contacto el uso compartido de flores, uno de esos virus es transmitido de abejas infectadas a abejorros y vice-versa (Singh *et al.* 2010). Adicionalmente, Graystock *et al.* (2015) comprobaron experimentalmente que abejorros y abejas melíferas pueden ser vectores de patógenos transportándolos desde flores contaminadas por la visita de individuos interespecíficos infectados (en este caso, abejas melíferas y abejorros) hacia flores que estaban libres de patógenos. Estos datos sugieren que las flores pueden ser focos importantes para la transmisión y dispersión de patógenos en el ambiente y entre potenciales hospederos. Por otro lado, el ocasional robo de alimento almacenado por otras especies también puede ser un factor que influya en la transmisión interespecífica de patógenos (ej: abejorros que roban la miel de las colmenas de abejas).

Entre los ejemplos más conocidos de saltos de hospedero en abejas se encuentra el caso del ácaro *Varroa destructor* que se propagó rápidamente por casi todo el mundo en *A. mellifera* luego que esta entrara en contacto con el hospedero original del ácaro, *A. cerana*, en Asia (Oldroyd 1999). Se ha sugerido una situación similar para el microsporidio intestinal *Nosema ceranae*, aunque aún no está claro cuando ocurrió el salto ni si efectivamente fue desde *A. cerana* (Fries 2010). En abejorros el “derrame de parásitos” y los saltos de hospedero desde especies criadas para comercialización hacia conspecíficos y congéneres silvestres ha sido documentado por diferentes autores en distintas partes del mundo (Colla *et al.* 2006, Otterstatter & Thomson 2008, Stout & Morales 2009, Meeus *et al.* 2011, Murray *et al.* 2013, Graystock *et al.* 2014) (Tabla 1). Por otro lado, son numerosos los trabajos que evidencian que un gran número de parásitos y patógenos son compartidos por abejas melíferas y abejorros, demostrando en muchos casos la existencia de “derrame” desde un grupo al otro (Tabla 1) (Plischuk *et al.* 2011, Li *et al.* 2012, Reynaldi *et al.* 2013, Gamboa *et al.* 2015, revisado en Goulson & Hughes 2015 y Manley *et al.* 2015). Algunos parásitos parecen tener rangos de hospederos amplios encontrándose además en otras especies de abejas (por ej: varios virus y *N.*

ceranae). En muchos de los casos de patógenos compartidos, especialmente aquellos que involucran patógenos multi-hopederos, los datos disponibles hasta el momento no permiten determinar la dirección de la transmisión entre las especies o de desde cuál especie ocurrió originalmente el salto de hospedero. No obstante, es claro el potencial que existe para el “derrame” de parásitos y patógenos desde poblaciones manejadas (abejas melíferas y algunos abejorros) hacia comunidades silvestres aumentando en el mejor de los casos la prevalencia de patógenos ya existentes (Goulson & Hughes 2015).

Tabla 1 – Patógenos y parásitos de abejas melíferas y abejorros para los que existe evidencia de “derrame” hacia poblaciones o especies aparentemente libres del patógeno o con prevalencias bajas.

Parásito	Tipo de parásito	Especies reservorio	Especies receptoras
<i>Apicystis bombi</i>	Protozooario Neogregarino	Abejorros comerciales	Abejorros silvestres ² Abejas melíferas ²
<i>Crithidia bombi</i>	Protozooario Tripanosoma	Abejorros comerciales	Abejorros silvestres ^{2,3}
<i>Nosema bombi</i>	Hongo Microsporidio	Abejorros comerciales	Abejorros silvestres ^{2,3}
<i>Nosema ceranae</i> ¹	Hongo Microsporidio	Abejas melíferas Abejorros comerciales	Abejorros ^{2,3} Abejorros silvestres ^{2,3}
<i>Locustacarus buchneri</i>	Ácaro	Abejorros Comerciales	Abejorros silvestres ^{2,3}
Virus de las alas deformes (DWV) ¹	Virus Iflaviridae	Abejas melíferas	Abejorros ^{2,3}
Virus de parálisis lenta de la abeja (SBPV)	Virus Iflaviridae	Abejas melíferas	Abejorros ²
Virus israelí de parálisis aguda (IAPV)	Virus Dicistroviridae	Abejas melíferas	Abejorros ²
Virus de parálisis aguda de la abeja (ABPV)	Virus Dicistroviridae	Abejas melíferas	Abejorros ²
Virus Kashmir de la abeja (KBV)	Virus Dicistroviridae	Abejas melíferas	Abejorros ²
Virus de la celda negra de la reina (BQCV) ¹	Virus Dicistroviridae	Abejas melíferas	Abejorros ²
Virus de la cría ensacada (SBV) ¹	Virus Dicistroviridae	Abejas melíferas	Abejorros ²
Virus del Lago Sinai (LSV)	Virus	Abejas melíferas	Abejorros ⁴
<i>Ascospaera</i> spp	Hongo	Abejas melíferas	Abejorros ²
<i>Aethina tumida</i>	Coleóptero	Abejas melíferas	Abejorros ^{2,3}

¹Encontrados además en otras especies de abejas; ²Goulson & Hughes 2015; ³Stout & Morales 2009; ⁴Gamboa *et al.* 2015

2.4. La eusocialidad y los parásitos

Todo parásito debe infectar y establecerse en un hospedero y luego ser transmitido a un nuevo hospedero susceptible. La capacidad de un parásito para infectar y establecerse en un hospedero y la variabilidad en la susceptibilidad del hospedero a la infección están basadas en la interacción entre los genotipos del parásito y el hospedero. Por otro lado, la transmisión del parásito depende de la probabilidad de encontrar nuevos hospederos susceptibles (Schmid-Hempel 1995, 2001). En este sentido, los insectos sociales plantean un escenario ventajoso para los patógenos: las colonias están formadas por muchos individuos cercanamente emparentados y por tanto genéticamente similares, viven agrupados en un mismo nido e interactúan frecuentemente (Schmid-Hempel 1995, 2001). Estas características han llevado a que varios autores propongan que la biología de los insectos sociales es afectada de forma importante por la evitación del parasitismo, especialmente la evolución de determinadas características como la elevada variabilidad genética dentro de las colonias de algunas especies (Schmid-Hempel 1995, 2001), la estricta división de tareas (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel 1993, Schmid-Hempel 1995) o la organización y arquitectura del nido (Pie *et al.* 2004). Las acciones colectivas o comportamientos altruistas que resultan en la evitación, control o eliminación de infecciones parasitarias son denominados en conjunto, inmunidad social (Cremer *et al.* 2007).

Las diferencias en la ploidía y en el comportamiento en relación al mantenimiento de la colonia que existen entre hembras y machos de himenópteros sociales, es un factor a considerar cuando se analiza la incidencia de patógenos, ya que pueden existir diferencias entre los sexos en la susceptibilidad a la infección o en la probabilidad de adquirir el patógeno. En relación a la haplo-diploidía, O'Donnell & Beshers (2004) en su hipótesis de la susceptibilidad haploide, proponen que los machos haploides serían particularmente susceptibles a los parásitos ya que poseen una única copia de cada gen y que esto podría haber tenido un rol en la evolución del sistema eusocial de los himenópteros. Así se explicaría que las colonias estén compuestas únicamente por hembras diploides (los machos son de aparición estacional) y que existan marcadas diferencias comportamentales entre hembras y machos. Esta hipótesis ha sido puesta a prueba mediante estudios

en los que se realizan infecciones experimentales de hembras y machos en distintas especies de himenópteros para diferentes patógenos, resultando en datos contradictorios. Algunas investigaciones han obtenido resultados que apoyan la hipótesis (e.g. revisado en Ruiz-González & Brown 2006, Invernizzi 2012), mientras que otras no (e.g. revisado en Ruiz-González & Brown 2006, Rutretch & Brown 2009). En abejorros en particular, los resultados de trabajos que involucran infecciones experimentales no apoyarían la hipótesis de susceptibilidad haploide (Schmid-Hempel & Loosli 1998, Ruiz-González & Brown 2006, Rutretch & Brown 2009). Otros estudios que muestran una mayor prevalencia o nivel de infección en machos de abejorros en condiciones naturales (Shykoff & Schmid-Hempel 1991, Otti and Schmid-Hempel, 2007, Gillespie 2010, Huth-Schwarz *et al.* 2012) no son pruebas rigurosas que apoyen la hipótesis de susceptibilidad haploide, ya que el patrón observado puede deberse a otras causas. Una de ellas puede ser que las hembras altamente infectadas sean menos activas y por tanto sea menos probable encontrarlas en las flores forrajeando (Shykoff & Schmid-Hempel 1991, Otti & Schmid-Hempel 2007). Por otro lado, los machos de abejorro abandonan el nido unos pocos días después de emerger (Goulson 2003, Heinrich 2004). El comportamiento diferente en los machos de abejorros, y más en general en los himenópteros sociales, que implica que no participan en las tareas de mantenimiento, limpieza y aprovisionamiento de la colonia, que forrajean para su propio consumo y que vuelan en muchos casos grandes distancias para aparearse, hacen que la probabilidad de contraer patógenos sea diferente que en las hembras. La prevalencia o nivel de infección resultante en comparación con las hembras, dependerá del parásito específico, del tiempo necesario para adquirir la infección, de su forma de transmisión principal (e.g. dentro de la colonia, a través de los recursos florales, etc.), entre otros factores (Huth-Schwarz *et al.* 2012).

2.5. Principales parásitos que afectan a los abejorros

Los abejorros son hospederos de una gran variedad de parásitos y patógenos como virus, bacterias, hongos, protozoarios, nemátodos, microhimenópteros y dípteros parasitoides y ácaros (Schmid-Hempel 2001). En muchos de los casos parecerían ser parásitos generalistas encontrándose en distintas especies de abejorros (Schmid-Hempel 2001, Tay *et al.* 2005, Maggi *et al.* 2011). En las especies nativas de América del Sur se ha registrado la presencia de diversos parásitos (Plischuk *et al.* 2009, 2013, 2015, datos no publicados, Arbulo *et al.* 2010, Maggi *et al.* 2011, Arbetman *et al.* 2012, Plischuk & Lange 2012, Reynaldi *et al.* 2013, Schmid-Hempel *et al.* 2014, Gamboa *et al.* 2015) (Tabla 2). Por otro lado, varios patógenos han sido registrados en las especies de abejorro introducidas en América del Sur (Plischuk & Lange 2009, Plischuk *et al.* 2011, Arbetman *et al.* 2012, Schmid-Hempel *et al.* 2014) que potencialmente podrían saltar a las especies nativas causando importantes daños en sus poblaciones como ha sido propuesto para la declinación de *B. dahlbomii* (Arbetman *et al.* 2012, Schmid-Hempel *et al.* 2014). En general se conoce muy poco acerca de la epidemiología y los efectos de los parásitos de abejorros, con excepción de unas pocas especies entre las que se destaca el microsporidio *Nosema bombi*. Adicionalmente, la mayoría de los trabajos en estos temas han sido realizados en unas pocas especies de abejorro, principalmente la especie europea *Bombus terrestris*. Teniendo en cuenta que los parásitos pueden tener efectos diferentes en distintos hospederos, los datos obtenidos no deberían ser extrapolados a otras especies (Meeus *et al.* 2011).

2.6. Los microsporidios

Los microsporidios constituyen un grupo de hongos unicelulares altamente especializados (Capella-Gutiérrez *et al.* 2012). Son parásitos intracelulares obligados que infectan a casi todos los grupos animales, así como a algunos protozoarios, siendo particularmente comunes en peces e insectos (Keeling & Fast 2002, Franzen 2008, Solter 2008). El estado infectivo de los microsporidios es una única célula altamente organizada: la espora, única etapa del ciclo de vida de los microsporidios que es viable fuera de la célula hospedera (Keeling & Fast 2002, Franzen 2008). Estos parásitos han evolucionado un mecanismo de infección sofisticado y único. Una de las características singulares es la presencia de un filamento o tubo polar enrollado dentro de la espora que se everta cuando la espora es activada inyectando el contenido de la misma (esporoplasma) en el interior de la célula hospedera (Figura 3) (Keeling & Fast 2002, Solter 2008). Muchos microsporidios poseen múltiples especies hospederas (Fries 2010), pero usualmente se trata de especies cercanamente emparentadas (Solter 2008).

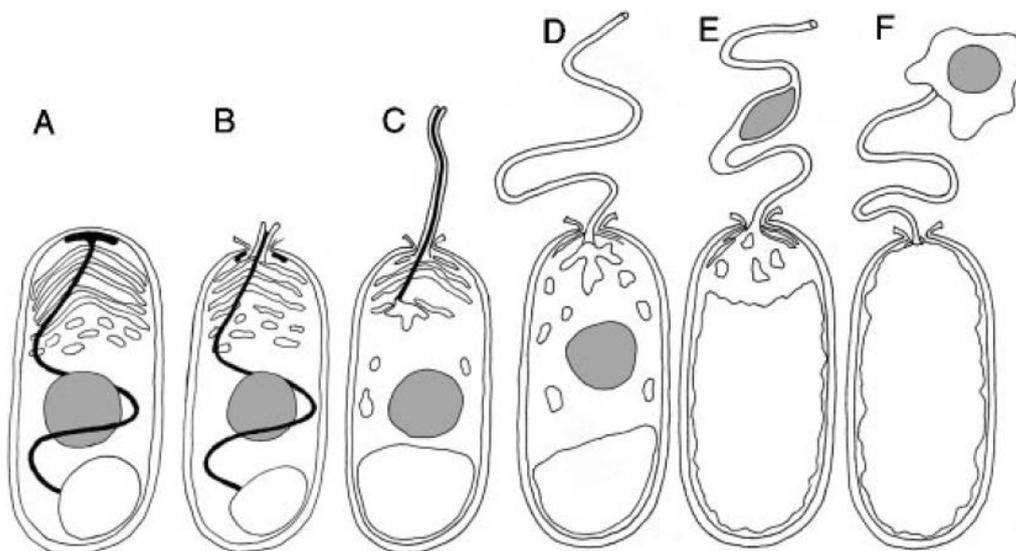


Figura 3 – Eversión del tubo polar durante la germinación de la espora. A) Espora dormante (filamento polar, núcleo, polaroplasto y vacuola posterior). B) El polaroplasto y la vacuola se hinchan, el disco de anclaje se rompe, y el filamento polar empieza a evertir. C) El filamento polar continúa su eversión. D) Una vez que el tubo polar está totalmente evertido, el esporoplasma es forzado hacia dentro y E) a través del tubo polar. F) El esporoplasma emerge desde el tubo polar rodeado de nueva membrana. Tomado de Keeling & Fast 2002.

2.7. Microsporidios del género *Nosema* en ápidos

Entre los microsporidios que parasitan insectos, las especies del género *Nosema* probablemente sean las mejor conocidas debido a que causan enfermedades en especies de importancia económica como el gusano de seda, varias plagas agrícolas, abejas melíferas y abejorros (Solter 2008). En el grupo de las abejas corbiculadas (Apidae), que incluye a abejas melíferas y abejorros (Michener 2007), han sido identificadas tres especies del género *N. apis*, *N. bombi* y *N. ceranae*, aunque el trabajo de Li *et al.* (2011) sugiere una mayor diversidad de especies de *Nosema* en los abejorros en China.

Las esporas de *Nosema* sp. ingresan al hospedero vía oral e infectan las células epiteliales del intestino, pudiendo posteriormente extenderse la infección a otros tejidos dependiendo de la especie del patógeno. Las esporas germinan en el intestino e inyectan el esporoplasma dentro de las células epiteliales a través del filamento polar. En la célula ocurre la multiplicación del microsporidio que pasa por diferentes etapas (meronte, esporogonia, esporonte y espora madura) hasta que las esporas maduras son liberadas a la luz del intestino por lisis celular (Figura 4). Las esporas maduras son eliminadas con las heces o pueden re-infectar células vecinas.

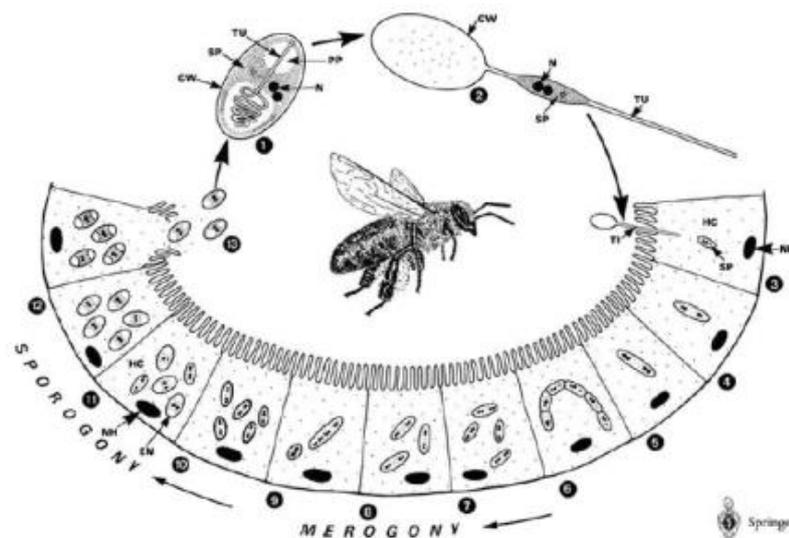


Figura 4 – Diagrama del ciclo infeccioso de *Nosema* sp en las células epiteliales del intestino de *A. mellifera*. CW: pared de la espora. SP: esporoplasma. TU: túbulo polar. N: núcleo. PP: polaroplasto. HC: citoplasma celular. NH: núcleo celular.

Históricamente, la presencia de nosemosis se determinaba mediante la detección de esporas en el microscopio óptico. Las esporas de *Nosema* tienen una forma oval característica (“grano de arroz”) y las especies difieren en su tamaño. La espora de *N. ceranae* tiene un tamaño aproximado $4,5 \times 2,4 \mu\text{m}$ (Huang *et al.* 2007) con un rango de $3,3\text{-}5,5 \times 2,3\text{-}3,0 \mu\text{m}$ (Fries *et al.* 1996). La espora de *N. apis* es levemente mayor, con un tamaño promedio de $5.34 \times 2.46 \mu\text{m}$ (Li *et al.* 2005). En *N. bombi* las esporas son altamente variables en tamaño y forma (redondeadas, ovals, alargadas) con un rango de variación de $2,77\text{-}6,63 \times 1,69\text{-}3,13 \mu\text{m}$ (Larsson 2007) y un tamaño promedio de $4.88 \times 2.88 \mu\text{m}$ en su forma oval más común (Li *et al.* 2005) (Figura 5). A pesar de estas diferencias de tamaño, la identificación correcta de la especie del patógeno mediante microscopía óptica es difícil, especialmente cuando ocurren coinfecciones de más de una especie de microsporidio. Por esta razón, son necesarias técnicas más especializadas para discriminar las especies de *Nosema*. La microscopía electrónica permite observar diferencias en la ultraestructura de las esporas de las diferentes especies (Figura 6). Esas diferencias yacen principalmente en el largo del filamento polar que en *N. ceranae* tiene 20-23 vueltas (Fries *et al.* 1996), en *N. apis* 26-32 (Fries *et al.* 2006) y en *N. bombi* 13-24 (Larsson 2007).

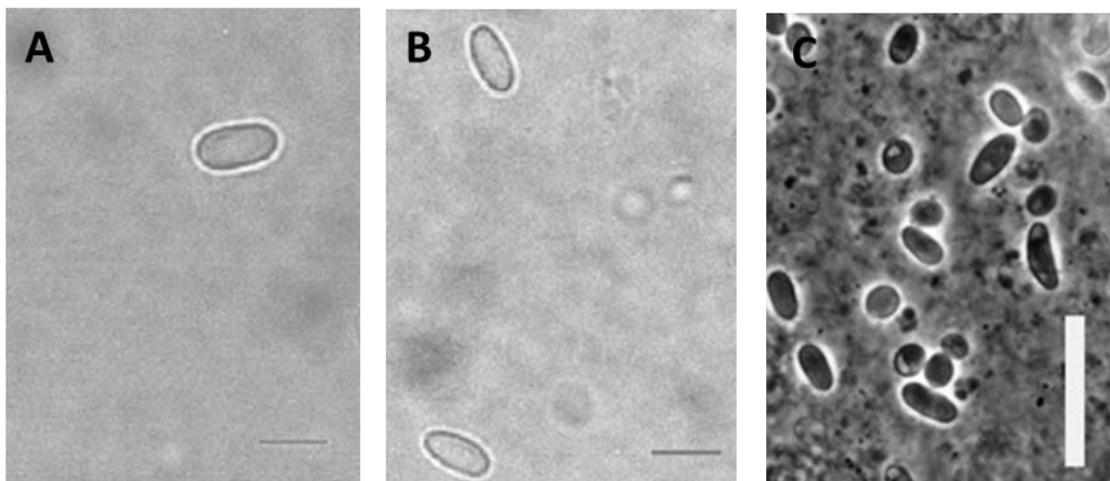


Figura 5 – Microscopía óptica de esporas de A) *N. apis*, B) *N. ceranae* y C) *N. bombi*. Las esporas de *N. apis* son mayores que las de *N. ceranae*, sin embargo pueden ser difíciles de distinguir al microscopio óptico. Las esporas de *N. bombi* tienen una gran variación de forma y tamaño. Barra A) y B) = $5 \mu\text{m}$; C) = $10 \mu\text{m}$. A) y B) tomado y modificado de Fries *et al.* 2006 y C) tomado y modificado de Larsson 2007.

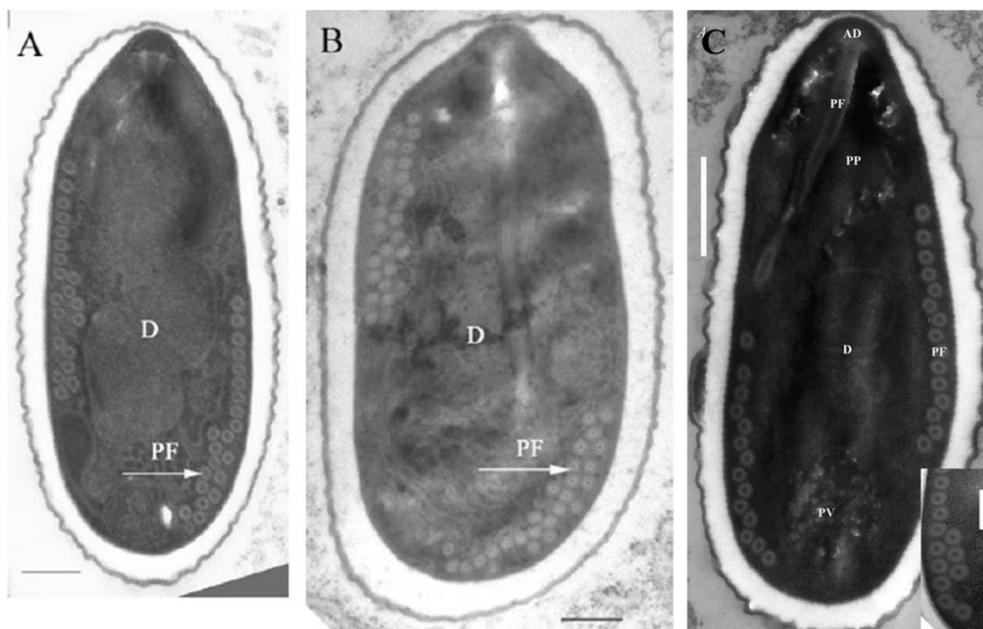


Figura 6 – Ultraestructura de las esporas de A) *Nosema ceranae*, B) *N. apis* y C) *N. bombi*. D: diplocarion; PF: filamento polar; AD: disco de anclaje; PP: polaroplasto; PV: vacuola posterior. Barra = 0,5 μ m. A) y B) tomado de Fries *et al.* 2006 y C) tomado de Larsson 2007.

Actualmente, las técnicas moleculares basadas en las diferencias genéticas entre las especies son las más utilizadas para identificar los microsporidios presentes en abejas y abejorros. En las últimas décadas se han desarrollado diversas herramientas moleculares basadas en las secuencias genéticas de la subunidad menor 16S (SSU) del ARN ribosomal y de otras regiones del genoma que permiten distinguir claramente, con mayor o menor sensibilidad, las especies de microsporidio. Estas herramientas han permitido, entre otras cosas, determinar con mayor especificidad la identidad de los microsporidios presentes en muestras históricas de *A. mellifera* que habían sido clasificados como *N. apis*. En este sentido, se ha constatado que *N. ceranae* está presente en *A. mellifera* desde al menos 1998 en Europa (Paxton *et al.* 2007), 1995 en EEUU (Chen *et al.* 2007) y desde 1979 en América del Sur (Teixeira *et al.* 2013).

2.8. Epidemiología y patogenicidad de *Nosema* sp. en ápidos

2.8.1. *Nosema apis*

Nosema apis fue descrito hace más de cien años en *A. mellifera* y hasta el 2005 era el único patógeno considerado causante de nosemosis en esta especie (Higes *et al.* 2006, 2010). Los principales síntomas de la nosemosis causada por *N. apis* (“nosemosis tipo A”) son: ventrículo de las abejas blanquecino e hinchado, obreras temblorosas y con abdómenes dilatados, marcas fecales marrones en la entrada de la colmena como consecuencia de disentería, abejas enfermas o muertas en la cercanía de la colmena, disminución de la cría y del tamaño de la colonia, especialmente en primavera. Es una enfermedad con una marcada estacionalidad, caracterizada por altos niveles de infección durante la primavera, niveles bajos de infección durante verano e invierno y un pequeño pico en otoño (Higes *et al.* 2010). Es considerada una enfermedad pandémica, aunque luego de la identificación de *N. ceranae* como patógeno de *A. mellifera*, algunos resultados fueron interpretados como si *N. apis* estuviese siendo desplazada por *N. ceranae* (Paxton *et al.* 2007). No obstante, estudios más recientes sugieren que esto no es así y que *N. apis* se mantiene junto con *N. ceranae* pero a una frecuencia menor y con su estacionalidad característica (Martín-Hernández *et al.* 2012, Higes *et al.* 2013).

2.8.2. *Nosema bombi*

N. bombi es un parásito generalista de los abejorros encontrándose en diversas especies europeas (Tay *et al.* 2005) y norteamericanas (Cameron *et al.* 2011), aunque nunca se ha registrado en especies sudamericanas. En general, *N. bombi* ingresa al hospedero a través de la ingesta de sus esporas e infecta las células epiteliales del intestino y los túbulos de Malpighi, pudiendo posteriormente diseminarse por el hospedero (Otti & Schmid-Hempel 2007). Los túbulos de Malpighi son el principal órgano infectado (Larsson 2007), pero también puede infectar las células epiteliales del intestino medio (ventrículo), los cuerpos grasos, los músculos del tórax y el tejido nervioso (Fries *et al.* 2001, Larsson 2007).

La transmisión de *N. bombi* de una generación a la otra ocurre a través de las reinas fundadoras infectadas previamente a su hibernación. La propagación dentro de la colonia ocurre principalmente vía polen y néctar contaminado (Rutrecht *et al.* 2007, van der Steen 2008, Meeaus *et al.* 2011), pudiendo ser infectados tanto los adultos como las larvas (Schmid-Hempel & Loosli 1998, van der Steen 2008). También existe evidencia de la posible transmisión transovárica de esporas de *N. bombi* (Rutrecht & Brown 2008, van der Steen 2008). La transferencia entre colonias diferentes puede ocurrir a través de pecoreadoras que acarrear desde las flores polen y néctar contaminado o de obreras infectadas que derivan a otros nidos (Durrer and Schmid-Hempel, 1994; Imhoof and Schmid-Hempel, 1999, van der Steen 2008, Meeaus *et al.* 2011, Murray *et al.* 2013).

Los efectos que puede causar la infección de *N. bombi* son variados, entre estos se encuentran: disminución del tamaño de las colonias (Otti & Schmid-Hempel 2008, Rutrecht & Brown 2009), menor probabilidad de producir sexuos y reducción de la tasa de reproducción individual de hembras y machos (Otti & Schmid-Hempel 2007, 2008), las reinas infectadas poseen menos probabilidades de iniciar una colonia y por tanto disminuye el *fitness* de las colonias de origen de esas reinas (van der Steen 2008), reducción de la supervivencia de machos y hembras (Schmid-Hempel & Loosli 1998, Otti and Schmid-Hempel 2007, 2008, Rutrecht & Brown 2009), afecta el comportamiento de las obreras (i.e. no ejercen correctamente las tareas de limpieza) y por tanto, el mantenimiento de la colonia (Otti and Schmid-Hempel 2007).

La patogenicidad, la prevalencia y el impacto de *N. bombi* en los abejorros pueden variar dependiendo de la especie hospedera (Durrer & Schmid-Hempel 1995, Schmid-Hempel & Loosli 1998, Fries *et al.* 2001, Tay *et al.* 2005, Larsson 2007, Rutrecht & Brown 2008, 2009, Cameron *et al.* 2011, Cordes *et al.* 2012), de la población hospedera (Cameron *et al.* 2011, Cordes *et al.* 2012, Huth-Schwarz *et al.* 2012), de la colonia hospedera (Schmid-Hempel & Loosli 1998, Baer & Schmid-Hempel 1999, Rutrecht & Brown 2008, Huth-Schwarz *et al.* 2012) y del sexo del abejorro (Shykoff & Schmid-Hempel 1991, Gillespie 2010, Huth-Schwarz *et al.* 2012, Murray *et al.* 2013). La existencia de estas diferencias sugiere una marcada interacción entre *N. bombi* y sus

hospederos basada probablemente en interacciones entre los genotipos del parásito y los hospederos (Schmid-Hempel 2001). A través del análisis de ARN ribosomal, se ha identificado un gran número de variantes genéticas de *N. bombi* (Tay *et al.* 2005, Cordes *et al.* 2012). A pesar de esto, no se ha encontrado evidencia de cepas o variantes hospedero-específicas en las especies europeas (Tay *et al.* 2005) ni en las especies norteamericanas de abejorros (Cordes *et al.* 2012) que puedan explicar las diferencias interespecíficas observadas en la interacción parásito-hospedero. Las variantes identificadas se encuentran distribuidas en las distintas especies de abejorros e incluso las secuencias norteamericanas son idénticas a las europeas, con excepción de un alelo único para Estados Unidos (Cordes *et al.* 2012). Por otro lado, la variabilidad genética de la población del hospedero también juega un rol importante en las interacciones parásito-hospedero (Schmid-Hempel 2001, 2011). En este sentido, Cameron *et al.* (2011) encontraron que en poblaciones de abejorros con menor variabilidad genética la prevalencia de *N. bombi* era mayor.

Cada colonia de abejorros puede ser infectada exitosamente por un número determinado de cepas o variantes de un parásito que con el pasar del tiempo determinarán un perfil de variantes establecidas (Schmid-Hempel 2001). Las diferencias en la incidencia de *N. bombi* entre colonias de una misma especie, podría deberse a infecciones resultantes de diferentes perfiles de variantes del patógeno. No existen hasta el momento trabajos que exploren este aspecto a nivel de la colonia, pero a nivel individual se han encontrado secuencias diferentes del ITS de *N. bombi* en muestras aisladas de un mismo abejorro, lo que podría indicar infecciones debidas a más de una variante (Tay *et al.* 2005, Li *et al.* 2011). Por otro lado, al igual que a nivel poblacional, existe evidencia de que a mayor variabilidad genética en la colonia menor es el grado de infección por *N. bombi* (Baer & Schmid-Hempel 1999, Huth-Schwarz *et al.* 2012).

Las diferencias en los efectos de *N. bombi* sobre machos y hembras son contradictorios si comparamos experiencias de infección experimental y resultados a campo. En los primeros en general no hay diferencias o las hembras son levemente más afectadas (Schmid-Hempel & Loosli 1998, Ruiz-

González & Brown 2006, Rutretch & Brown 2009), mientras que en el campo los machos suelen estar más afectados (Shykoff & Schmid-Hempel 1991, Otti and Schmid-Hempel, 2007, Gillespie 2010, Huth-Schwarz *et al.* 2012). Los resultados de laboratorio sugieren que no existen diferencias de susceptibilidad entre los sexos y los resultados de campo reflejarían la influencia de otros factores como los mencionados anteriormente.

Hasta el 2009, año en el que se registra por primera vez la presencia de *N. ceranae* en abejorros (Plischuk *et al.* 2009), *N. bombi* era el único microsporidio que se conocía en abejorros (Tay *et al.* 2005).

2.8.3. *Nosema ceranae*

Nosema ceranae, es actualmente uno de los patógenos más prevalentes en *A. mellifera* en todo el mundo (Higes *et al.* 2013). Descrito originalmente en la abeja melífera asiática, *Apis cerana* (Fries *et al.* 1996), en 2006 se encontró como un patógeno emergente en las abejas melíferas occidentales *A. mellifera* (Higes *et al.* 2006). Desde entonces, ha sido reportado en casi todos los países que realizan apicultura (Klee *et al.*, 2007, Fries 2010). Adicionalmente, en los últimos años *N. ceranae* ha sido encontrado en otras especies hospederas dentro de la superfamilia Apoidea, incluyendo distintas especies de *Apis* (Chaimanee *et al.* 2010, Botias *et al.* 2012), varias especies de abejorros (Plischuk *et al.* 2009, Li *et al.* 2012, Graystock *et al.* 2013) y algunas abejas solitarias (Ravoet *et al.* 2014). El amplio rango de hospederos que muestra *N. ceranae* es de importante interés epidemiológico y ecológico, ya que los parásitos podrían ser transmitidos entre individuos hospederos que comparten recursos florales y de esta forma diseminarse fácilmente en la comunidad de abejas con consecuencias potencialmente devastadoras sobre las diferentes especies (Durrer & Schmid-Hempel 1994, Singh *et al.* 2010, Graystock *et al.* 2015).

En *A. mellifera*, *N. ceranae* es el agente causante de la nosemosis “tipo C”, que se distingue de la nosemosis “tipo A” principalmente por la falta de estacionalidad pudiendo detectarse a lo largo del año (Higes *et al.* 2010) y por no ocasionar disentería (Fries 2010). Las esporas son ingeridas por las abejas durante las actividades de limpieza de la colmena, por alimento contaminado

(incluso durante la trofalaxia) o durante las actividades de pecoreo (Higes *et al.* 2010).

La infección de *N. ceranae* ocurre principalmente en las células del epitelio ventricular, aunque se ha detectado en otros tejidos por métodos moleculares pero sin evidencia histopatológica (Fries 2010, Higes *et al.* 2010). La degeneración del epitelio digestivo de *A. mellifera* provocada por *N. ceranae* hacen que el ventrículo de las abejas infectadas se observe blanquecino y encogido (Figura 7). A nivel celular, las lesiones anatomopatológicas incluyen la presencia de vacuolas en el citoplasma y la alteración del núcleo que puede verse reducido en tamaño. Las células parasitadas se observan agrandadas y contienen estructuras parasíticas en diferentes etapas del ciclo de vida del microsporidio incluyendo esporas maduras (Figura 8). Cuando la infección ya está establecida la mayoría de las células epiteliales, incluso las regenerativas, muestran signos de degeneración. Estos efectos sumados a la capacidad auto-infectiva de las esporas que permite una rápida diseminación de la infección parasitando un gran número de células, y a la alta tasa de mortalidad que puede provocar en las abejas, demuestran la alta patogenicidad de *N. ceranae* en *A. mellifera* (Higes *et al.* 2007).

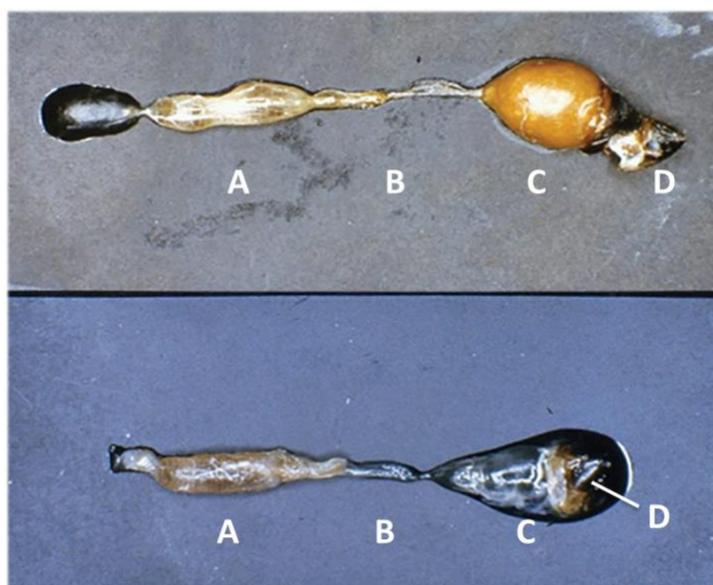


Figura 7 – Canal alimentario de *Apis mellifera*. Arriba: extraído de una abeja infectada con *Nosema* sp. donde se puede observar el ventrículo blanquecino; abajo: extraído de una abeja sana, en el cual se observa el ventrículo transparente. A: ventrículo; B: intestino delgado; C: recto; D: valvas del aguijón. Imagen modificada de: <http://www.beekeeping.com/practical-beekeeping-beekeeping-with-the-new-parasite/>. Autor: Wolfgang Ritter

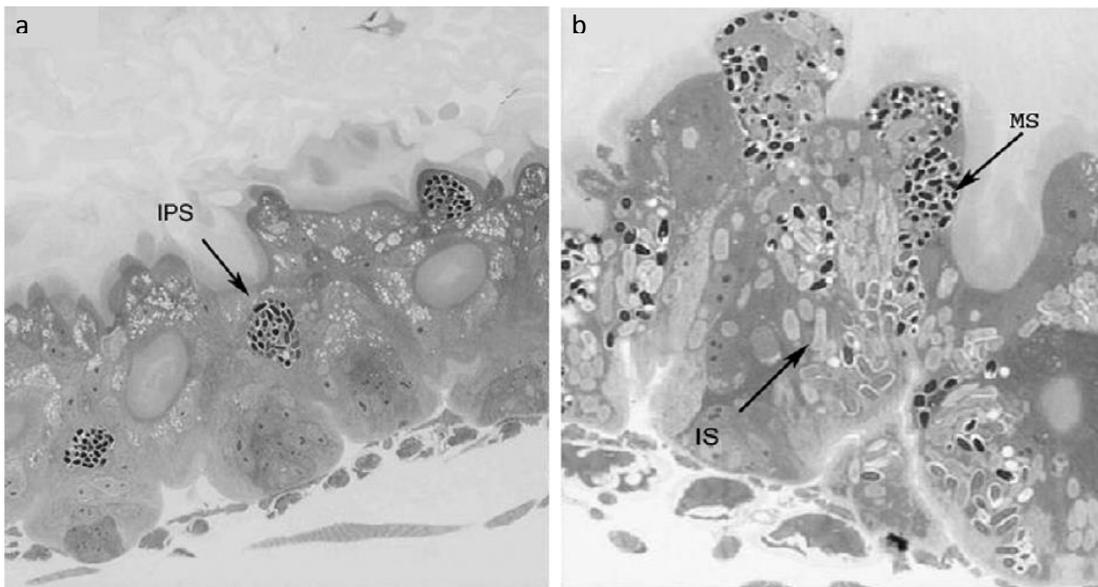


Figura 8 – Infección de las células del epitelio ventricular de *Apis mellifera* con *Nosema ceranae*. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía óptica a partir de cortes semifinos embebidos en resina y teñidos con azul de metileno. Se observan etapas intracelulares del ciclo de vida de *N. ceranae* (IPS) incluyendo etapas inmaduras (IS) y esporas maduras (MS). a) Epitelio al día 3 post infección, con unas pocas células infectadas en la región apical del tejido. b) Epitelio al día 6 post infección, con el tejido altamente infectado con parásitos empaquetados. Tomada de Higes *et al.* 2007

A nivel de la colonia, no parece haber síntomas claros de la infección causada por *N. ceranae* (Fries 2010), aunque Higes *et al.* (2012) sugiere como único signo claro al despoblamiento de las colonias (Higes *et al.* 2008, 2011). Se han reportado varios efectos que *N. ceranae* ejerce a nivel individual y de las colonias: lesiones severas en el epitelio del ventrículo que conducen a problemas nutricionales (Higes *et al.* 2007, 2008, 2010), disminución de la longevidad de las obreras (Higes *et al.* 2007, Paxton *et al.* 2007, Martín-Hernández *et al.* 2011), supresión del sistema inmune (Antúnez *et al.* 2009), cambios en los controles hormonales del comportamiento de obreras (por ej: regulación de la división de tareas) que lleva a un desarrollo comportamental acelerado y por tanto a la alteración de la homeostasis de la colonia (Dussaubat *et al.* 2010, Higes *et al.* 2010), reducción de la población adulta (Higes *et al.* 2008) y baja productividad de las colmenas (Higes *et al.* 2010).

El impacto de la infección de *N. ceranae* en las poblaciones de abejas melíferas es bastante variable. En España se ha constatado una alta virulencia

a nivel de la colonia y por tanto, una fuerte relación entre *N. ceranae* y la pérdida de colmenas (Martin-Hernández *et al.* 2007, Higes *et al.* 2008, 2009, 2010). Contrariamente, en la mayoría de los países donde se ha detectado *N. ceranae* no se ha podido establecer dicha asociación (Fries 2010, Genersch 2010). Estas diferencias pueden ser atribuidas a diferentes factores como por ejemplo el grado de tolerancia que distintas subespecies o razas de abejas melíferas pueden tener hacia el patógeno (Higes *et al.* 2013). Los factores ambientales también pueden estar involucrados; existe evidencia de que *N. ceranae* es más prevalente y devastadora en climas cálidos-mediterráneos que en climas templado-fríos (Martín-Hernández *et al.* 2012, Higes *et al.* 2013).

Por otro lado, se ha propuesto que las diferencias en los niveles de virulencia de *N. ceranae* podrían estar asociadas a la existencia de variantes genéticas de este patógeno presentes en poblaciones hospederas diferentes (Huang *et al.* 2008, Fries 2010, Branchiccela 2014, Sagastume *et al.* 2015). No obstante, las investigaciones han brindado resultados contradictorios. En algunos casos se han identificado variantes asociadas a regiones geográficas (Chen *et al.* 2009, Medici *et al.* 2012, Branchicela 2014) o incluso a hospederos específicos (Chaimanee *et al.*, 2011), mientras que en otros no (Dussaubat *et al.* 2013, Hatjina *et al.* 2011, van del Zee *et al.* 2014, Sagastume *et al.* 2015). Esto se debe en parte, a que los marcadores genéticos utilizados para estudiar las relaciones entre las distintas muestras de *N. ceranae* han sido diferentes y en muchos casos poco apropiados para estudiar la variabilidad genética y las relaciones filogenéticas en los microsporidios y en *N. ceranae* en particular (Higes *et al.* 2013).

Los marcadores más comúnmente utilizados han sido genes ribosomales. Los microsporidios presentan comúnmente múltiples copias de ARN ribosomal no homólogo (Tay *et al.* 2005, O'Mahony *et al.* 2007). Adicionalmente, Sagastume *et al.* (2011, 2013) encontraron una gran variabilidad genética en fragmentos del ADN ribosomal de *N. ceranae* (IGS y ARNr16S), representativo de la variabilidad del gen completo. Secuencias obtenidas del mismo aislamiento eran tan diferentes como las secuencias de muestras distintas, y una misma secuencia fue encontrada en muestras de diferentes áreas geográficas. Debido a estas características, los genes

ribosomales no son buenos marcadores para los análisis filogenéticos en este grupo y por tanto, se ha sugerido la utilización de genes de copia única como los que codifican para proteínas estructurales, para los estudios de variabilidad y relaciones filogenéticas en *Nosema* (O'Mahony *et al.* 2007, Fries 2010, Sagastume *et al.* 2011, 2013, Higes *et al.* 2013). En los últimos años, son cada vez más los estudios que evidencian gran diversidad genética en distintas regiones del genoma de *N. ceranae* alrededor del mundo (e.g. Sagastume *et al.* 2011, 2013, 2015, Roudel *et al.* 2013, Gómez-Moracho *et al.* 2013, Branchiccela 2014) y esto ha dificultado encontrar diferencias entre poblaciones de orígenes geográficos u hospederos diferentes que puedan dar cuenta de la variación en los efectos sobre los hospederos.

En abejorros, *N. ceranae* ha sido detectado hasta el momento, en tres especies de América del Sur (Plischuk *et al.* 2009, Arbulo *et al.* 2011, Gamboa *et al.* 2015), cuatro de Asia (Li *et al.* 2011) y siete de Europa (Graystock *et al.* 2013). Además, en el estudio de Graystock *et al.* (2013) se confirmó, en al menos una de las especies, que los abejorros son realmente infectados por *N. ceranae* y no son simplemente hospederos accidentales. La infección de *N. ceranae* en *B. terrestris* fue altamente virulenta reduciendo rápidamente la supervivencia de los abejorros, además de tener efectos subletales sobre el comportamiento (Graystock *et al.* 2013). Aunque estos hallazgos fueron reportados para una especie europea, Plischuk *et al.* (2009) detectaron lesiones macroscópicas en el ventrículo de abejorros de especies sudamericanas que estaban infectados con *N. ceranae*, similares a las encontradas en las abejas melíferas infectadas con dicho patógeno. Esto sugiere que los abejorros estaban parasitados realmente.

En Uruguay, *N. ceranae* está presente en las abejas melíferas desde antes de 1990 y está ampliamente extendido en el país (Invernizzi *et al.* 2009, Anido *et al.* 2015) causando daños importantes cuando las colmenas son trasladadas a las plantaciones de eucaliptos en otoño (Invernizzi *et al.* 2011, Mendoza *et al.* 2013). Adicionalmente, análisis preliminares en unas pocas muestras determinaron la presencia de *N. ceranae* en los abejorros nativos *B. atratus* y *B. bellicosus* (Arbulo *et al.* 2011). La presencia de *N. ceranae* en abejorros también en Argentina (Plischuk *et al.* 2009) y en Colombia (Gamboa

et al. 2015), sugiere que posiblemente este microsporidio esté ampliamente distribuido en los abejorros sudamericanos. Teniendo en cuenta todo esto, es esperable que *N. ceranae* esté presente en poblaciones de *B. atratus* y *B. bellicosus* de diferentes regiones del país.

3. CAPÍTULO 1

Detección, cuantificación y prevalencia de *Nosema ceranae* en *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus*

3.1. INTRODUCCIÓN

El amplio rango de hospederos y la gran diversidad genética de *N. ceranae* lo señalan como un patógeno altamente versátil que amenaza las comunidades de abejas en distintas partes del mundo. Lo expuesto hasta aquí plantea la necesidad de investigar acerca de los efectos de los distintos parásitos sobre las abejas nativas, especialmente aquellas con poblaciones vulnerables como *B. bellicosus* debido a su distribución cada vez más restringida (Martins & Melo 2009, Martins *et al.* 2015). Por los riesgos que potencialmente tienen sobre las poblaciones de abejorros, es de particular importancia conocer el comportamiento de los microsporidios del género *Nosema* en ambas especies de abejorros nativas. Dos de las características más comúnmente analizadas para un patógeno son la prevalencia y el nivel de infección. La prevalencia se refiere al porcentaje de individuos de una población que está infectado por el patógeno y el nivel de infección equivale al número de parásitos presentes en un individuo infectado.

En este capítulo de la tesis se estudiará la prevalencia y nivel de infección de *N. ceranae* en los abejorros nativos *B. atratus* y *B. bellicosus*. Adicionalmente, se estudiarán las relaciones genéticas entre aislamientos del microsporidio proveniente de ambas especies de abejorros y de *A. mellifera*.

3.2. HIPOTESIS

1. *Nosema ceranae* es la única especie del género que parasita a los abejorros *B. atratus* y *B. bellicosus* en Uruguay.
2. *Nosema ceranae* se encuentra ampliamente distribuida en las poblaciones de abejorros *B. atratus* y *B. bellicosus* en Uruguay.
3. Los abejorros son infectados por *N. ceranae*, descartando que se traten de hospederos accidentales.
4. La prevalencia e intensidad de infección de *N. ceranae* varía entre las dos especies de abejorros y entre sexos.
5. Las poblaciones de *N. ceranae* que parasitan a *B. atratus* y *B. bellicosus* están más relacionadas genéticamente entre sí que con las que infectan a *A. mellifera*.

3.3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia de microsporidios del género *Nosema* en los abejorros *B. atratus* y *B. bellicosus*.

3.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la(s) especie(s) del género *Nosema* presentes en los abejorros *B. atratus* y *B. bellicosus*.
2. Analizar la prevalencia de *Nosema* sp. en hembras y en machos de *B. atratus* y *B. bellicosus*.
3. Estudiar el nivel de infección de microsporidios en hembras y en machos de *B. atratus* y *B. bellicosus*.
4. Determinar la presencia de microsporidios en las células epiteliales del intestino de los abejorros.
5. Estudiar la relación genética entre aislamientos de *N. ceranae* provenientes de *B. atratus*, *B. bellicosus* y *Apis mellifera*.

3.5. MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.1. Recolección de abejorros

Durante marzo y abril de 2010, momento de pico poblacional de abejorros y producción de sexuados, se recolectaron un total de 526 abejorros, 317 *B. atratus* y 209 *B. bellicosus*. Los muestreos se realizaron en tres localidades del sur de Uruguay: en la estación experimental La Estanzuela del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA-LE) en el departamento de Colonia (34° 20' S, 57° 41' W), en el predio de Facultad de Agronomía en Montevideo (34° 50' S, 56° 13' W) y en un predio privado en Sauce departamento de Canelones (34° 40' S, 56° 02' W). En la Tabla 3 se muestra el número de abejorros recolectados por localidad, por especie y por sexo. Cada sexo fue recolectado de forma independiente definiendo un mínimo de 30 individuos como necesario para poder realizar los análisis posteriores.

Los abejorros fueron recolectados mientras se encontraban pecoreando sobre trébol rojo (*Trifolium pratense*) en praderas de entre dos y cinco hectáreas de extensión. Se seleccionó esta especie vegetal, una forrajera comúnmente cultivada en el país para alimentación del ganado (Izaguirre & Beyhaut 1997), por ser un recurso frecuentemente visitado por los abejorros.

La captura de los abejorros se realizó directamente sobre las flores usando frascos de plástico. Luego fueron sacrificados por enfriamiento (“*freeze killed*”) y mantenidos a -20°C hasta los análisis posteriores.

Tabla 3 – Número de abejorros recolectados por localidad, especie y sexo.

	<i>Bombus atratus</i>			<i>Bombus bellicosus</i>		
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Total
Montevideo	56	61	120	-	-	-
Canelones	49	56	105	62	31	93
Colonia	59	33	92	79	37	116
Total	167	150	317	141	68	209

3.5.2. Preparación de las muestras

En el laboratorio, el abdomen de los abejorros se separó del resto del cuerpo con una pinza y se maceró individualmente con 2 ml de etanol 95° utilizando un mortero de vidrio. Las herramientas utilizadas durante este

procedimiento se lavaron cuidadosamente entre cada muestra bajo agua corriente y luego varias veces con alcohol para evitar posible contaminación. Los macerados resultantes se colocaron en tubos eppendorf, se rotularon y se almacenaron a - 20°C hasta los análisis.

El resto del cuerpo de los abejorros (cabeza, tórax y apéndices) también se rotularon individualmente y se almacenaron a -20°C hasta pruebas posteriores.

3.5.3. Identificación de la especie de *Nosema*

La presencia e identidad de las especies de microsporidios fue determinada mediante técnicas moleculares en el Laboratorio de Patología del Centro Apícola Regional de Marchamalo (España).

3.5.3.1. Extracción de ADN

Previamente a la extracción de ADN, se eliminó el etanol de los macerados. Para esto, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 1ml de agua destilada. Esto fue realizado dos veces y finalmente los pellets fueron re-suspendidos en 250 µl agua destilada estéril.

150 µl de cada muestra se colocaron en placas de 96 pocillos (Qiagen) con perlas de vidrio (2 mm de diámetro) y las placas se sacudieron durante 6 minutos a 30 Hz para machacar el contenido de las muestras. Posteriormente, en cada pocillo se agregaron 30 µl de buffer ATL (Qiagen 19076) y 20 µl de Proteinasa K (Qiagen 19131) y las placas fueron incubadas durante toda la noche a 56°C.

Para realizar la extracción de ADN, las placas fueron centrifugadas y se preparó la mezcla de extracción *MASTER MIX*: 20 ml de buffer AL (Qiagen 19075), 20 ml de isopropanol y 3 ml de MagAttract Suspension G (Qiagen 1026901). En cada pocillo de la placa se agregaron 430 µl de la mezcla y se extrajo el ADN utilizando el protocolo de extracción BS96 DNA Tissue en un aparato BioSprint (Qiagen).

En todas las placas se incluyeron controles negativos de extracción.

3.5.3.2. Amplificación mediante PCR

La presencia de *N. ceranae* y *N. apis* se determinó mediante PCR *triplex* (*N. ceranae* + *N. apis* + *A. mellifera*), siguiendo el protocolo descrito por Martín-Hernández *et al.* (2012). Esta reacción amplifica simultáneamente un fragmento del gen que codifica para la subunidad menor del ARN ribosomal (16S ARNr) de cada especie de microsporidio y un fragmento del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) de *A. mellifera* (u otros himenópteros). Los *primers* utilizados para *N. ceranae* (218 – MITOC – F: 5' - CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA - 3' y 218 – MITOC – R: 5' - CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG - 3') y para *N. apis* (321 – APIS – F: 5' - GGGGGCATGTCTTTGACGTAATATGTA - 3' y 321 – APIS – R: 5' - GGGGGCGTTTAAATGTGAAACAATATG - 3') amplifican fragmentos de 218 pb y 321 pb, respectivamente (Martín-Hernández *et al.* 2007). Los primers para la COI de las abejas (COI – F: 5' - GGGTCCAAGACCAGGAACTGGAT - 3' y COI – R: 5' - GCGCGGAAATTCCTGATATATGAAGAGAAAA - 3') amplifican un fragmento de 119 pb y fueron incorporados en la reacción por Martín-Hernández *et al.* (2012) como control interno de la amplificación.

Para la reacción se utilizaron placas Biotools ADN Polimerasa conteniendo la mezcla (*master mix*) de la PCR *triplex* gelificada. En cada pocillo se añadieron 22,5 µl de agua y 2,5 µl de ADN. El volumen total de cada reacción fue de 50 µl y el programa de ciclado utilizado consistió en una temperatura inicial de 94°C por 6 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturalización, asociación durante 45 segundos a 61.8°C, extensión por 60 segundos a 72°C y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para determinar la presencia de *N. bombi* se utilizaron los primers BOMBI - F (5' - GGCCCATGCATGTTTTTGAAGATTATTAT - 3') y BOMBI - R (5' - TCTACACTTTAACGTAGTTATCTGCGG - 3') que amplifican un fragmento de 101 pb del ARN ribosomal del microsporidio (Plischuck *et al.* 2009). La PCR fue llevada a cabo en un volumen total de 25 µl usando la mezcla Fast Start PCR Master mix (No.04710452001 Roche Diagnostic), 0.4 µM de cada primer, 0.2 mg ml⁻¹ BSA, 0.1% Triton X-100 y 2.5 µl de ADN. Las condiciones de ciclado fueron una temperatura inicial de 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturalización, 30 segundos de asociación a 58,1°C,

45 segundos de extensión a 72°C y un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en un Mastercycler® ep gradient S apparatus (Eppendorf) y los productos fueron analizados en un QIAxcel System (Qiagen 9002123) usando un QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen 929002). Este dispositivo realiza electroforesis capilar con alta sensibilidad y resolución. El software asociado BioCalculator, brinda electroferogramas e imágenes de gel de la separación del ácido nucleico analizado.

En todas las reacciones se incluyeron controles negativos y controles positivos para las especies de microsporidios correspondientes, utilizando muestras positivas pertenecientes al Laboratorio de Patología del Centro Apícola Regional de Marchamalo.

3.5.3.3. Análisis de los datos

La prevalencia de cada especie de microsporidio identificada se calculó como el porcentaje de muestras que resultaron positivas para la especie correspondiente en el análisis por PCR. Este cálculo se realizó por localidad de colecta, especie y sexo.

Los datos fueron analizados por grupo (localidad: especie de abeja: sexo) para determinar si la prevalencia de los microsporidios es distinta a la esperada por azar. Se utilizó la prueba Chi cuadrado para comparar las proporciones de muestras positivas y muestras negativas en cada grupo.

3.5.4. Conteo de esporas

La intensidad de infección, medida como la cantidad de esporas por abeja, fue determinada en las muestras que resultaron positivas para *Nosema* sp en los análisis moleculares.

El conteo de esporas se realizó utilizando un hemocitómetro (Neubauer improved 5x5) y un microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i) a 400x. Una alícuota de cada macerado de abdomen de abeja fue colocado en el hemocitómetro y se contaron esporas en cinco cuadros (las cuatro esquinas y el centro) de

0.04 mm² de ubicados en la grilla central de la cámara. Cada uno de los cuadros contiene un volumen de 4x10⁻³ µl. El número promedio de esporas observadas en dicho volumen fue usado para calcular el número de esporas en el total de la muestra, correspondiente a la cantidad de esporas por abeja. En algunas muestras las esporas de *Nosema* no pudieron ser detectadas microscópicamente a pesar de que la reacción PCR, que es específica y muy sensible, fue positiva. El límite de detección de esporas del análisis microscópico fue calculado en 12500 esporas por abeja, que corresponde a encontrar una única espora en el volumen total analizado de una muestra (20x10⁻³ µl).

Debido a esto, la intensidad de infección fue analizada como una variable categórica. Se definieron las siguientes categorías: muy baja (< 12500 esporas), baja (de 12500 a 5x10⁵ esporas), media (de 5x10⁵+1 a 25x10⁵ esporas) y alta (> 25x10⁵ esporas).

Para de cada localidad, los datos fueron analizados utilizando el test de Mann-Whitney a un nivel de significancia de 0,05 para comparar el nivel de infección entre sexos para cada especie de abeja y entre especies dentro de cada sexo.

3.5.5. Análisis de las células epiteliales del intestino de los abejorros

A partir de abejorros muertos frescos (sin previo congelamiento o almacenamiento en alcohol) recolectados durante 2014 y 2015, se disecó el tubo digestivo de cada individuo tirando con pinzas del séptimo segmento abdominal (Fries *et al.* 2013). El tubo digestivo fue colocado en un portaobjeto, cubierto con un cubre objeto y aplastado aplicando una leve presión. Se retiró el cubre objetos y se dejó secar la muestra al aire. Luego se fijó el tejido con metanol 100% por 5 minutos y se volvió a secar al aire. Posteriormente, las muestras fueron teñidas utilizando solución Giemsa al 10% (en buffer PBS) por 10 minutos, que colorea todo el contenido de las esporas de azul (Gisder *et al.* 2010, Fries *et al.* 2013). Los preparados fueron secados al aire y observados al microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i).

3.5.6. Análisis del gen que codifica para PTP1 de *N. ceranae*

A partir de seis muestras de *B. atratus*, dos de *B. bellicosus* y cuatro de *Apis mellifera* positivas para *N. ceranae*, se amplificó y secuenció un fragmento del gen que codifica para la proteína del tubo polar 1 (PTP1). Cuatro de las muestras de *B. atratus* correspondieron a obreras recolectadas en Montevideo en abril de 2010 que también fueron utilizadas en los análisis de prevalencia y nivel de infección de *N. ceranae*. Las otras 2 muestras de *B. atratus* y las 2 de *B. bellicosus* provienen de obreras que fueron recolectadas en marzo de 2013 en Colonia, para complementar el presente análisis. Las muestras de *A. mellifera* pertenecen al Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y provienen de distintos departamentos del país: Canelones, Florida, Rivera y Soriano, colectadas en marzo de 2010. En estudios previos, se corroboró que estas muestras estaban infectadas con *N. ceranae*.

Los abdómenes de las nuevas muestras de abejorros fueron macerados como se describió previamente y se confirmó microscópicamente la presencia de *Nosema*.

La extracción del ADN fue realizada usando el kit comercial Qiamp Viral RNA mini Kit (Qiagen™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (este kit permite extraer tanto ADN como ARN). Este ADN se empleó como molde para amplificar un fragmento de 808pb del gen que codifica para la PTP1 de acuerdo al protocolo descrito por Chaimanee *et al.* (2011). Para esto se emplearon los *primers* NcORF 1664 - forward (5'-GACAACAAGGAAGACCTGGAAGTG-3') y NcORF 1664 - reverse (5'-TGT GAATAAGAGGGTGATCCTGTTGAG-3') (Chaimanee *et al.* 2011). La PCR fue realizada en un volumen total de reacción de 25µl conteniendo 1x PCR buffer, 0.1 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.2 µM de cada primer, 1 unidad de Taq polimerasa Platinum de alta fidelidad y 0.2 µl de ADN. El programa de ciclado consistió en una activación inicial a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, anillamiento a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador MultiGene OptiMax (Labnet Internacional, USA) en el Departamento de Microbiología del IIBCE. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de

agarosa 2 %, se tiñeron con GelRed, y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Posteriormente, los productos de la PCR fueron secuenciados en Macrogen (Corea del Sur) usando los primers NcORF 1664-forward y NcORF 1664-reverse.

Las secuencias de PTP1 obtenidas fueron alineadas con todas las secuencias publicadas de dicho gen, en la base de datos del National Center for Biotechnology Information, utilizando el software ClustalX. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando MEGA version 4 (Tamura *et al.* 2007).

3.6. RESULTADOS

3.6.1. Identificación de las especies de *Nosema* presentes en abejorros nativos de Uruguay

De las 526 muestras de *Bombus* spp analizadas, un total de 364 fueron positivas para *Nosema ceranae* (Figura 9). En una muestra se amplificó además el fragmento correspondiente al ARNr de *N. bombi*. Dado que este sería el primer hallazgo de esta especie en abejorros nativos de Uruguay y de América del Sur, el PCR se repitió con el fin de secuenciar el producto amplificado. Sin embargo, en las repeticiones del análisis no se obtuvieron resultados positivos, indicando que la cantidad de esporas de este microsporidio en la muestra es muy baja.

No se detectó la presencia de *N. apis* en ninguna de las muestras analizadas.

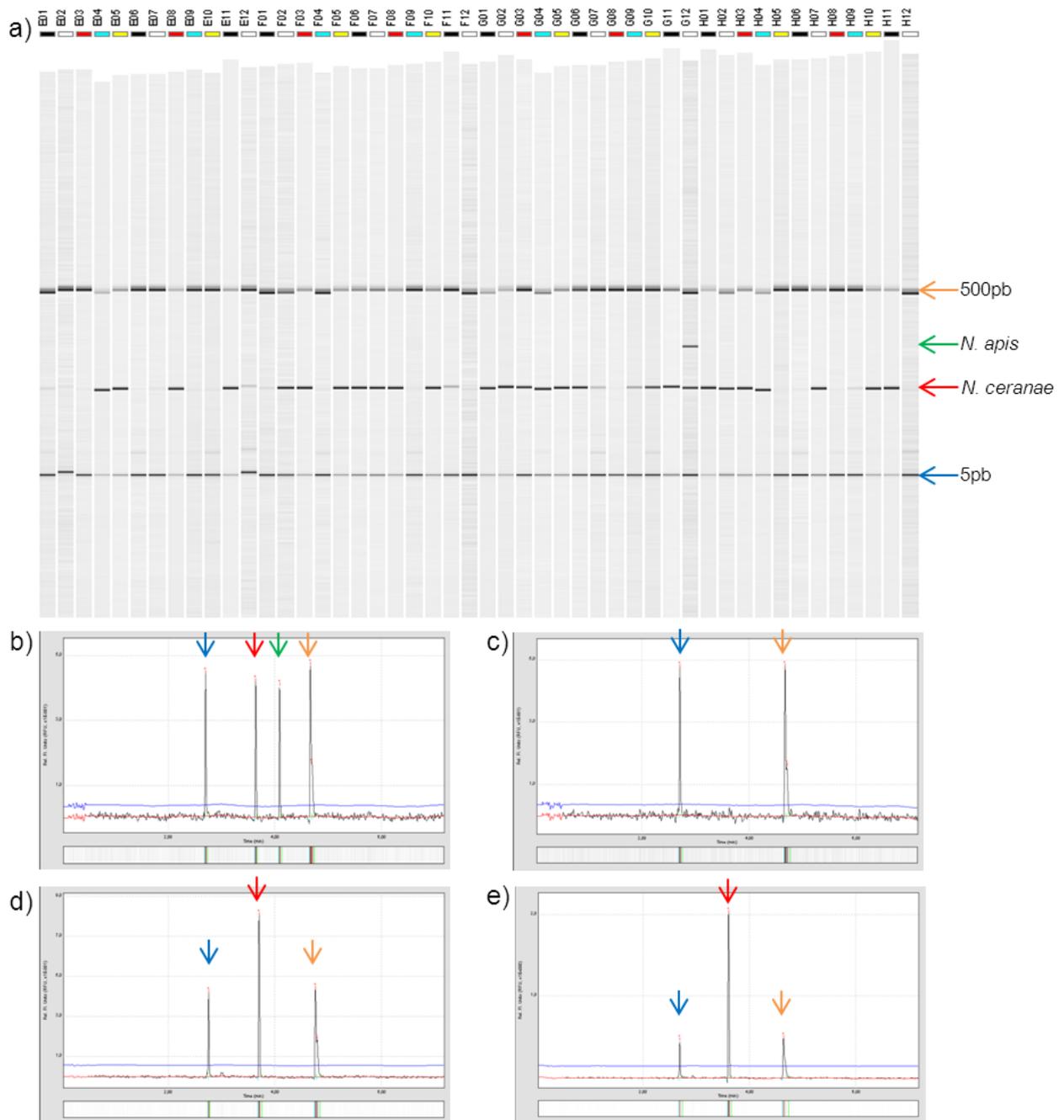


Figura 9 – Imagen de gel y electroferogramas de los productos de la PCR triplex (*N. ceranae* + *N. apis* + *A. mellifera*). a) Amplificación del fragmento de 218pb correspondiente a la unidad 16S del ARNr de *N. ceranae* en muestras correspondientes a obreras y machos de *B. atratus* recolectados en Montevideo y Canelones, respectivamente. Columna G12: control positivo para *N. ceranae* y *N. apis*; columnas F12 y H12: controles negativos. b) Electroferograma del control positivo donde se observan los dos picos extremos del marcador molecular (5pb-500pb) y los picos correspondientes a *N. ceranae* (218pb) y *N. apis* (321pb). c) Electroferograma de un control negativo donde se observan únicamente los picos del marcador. d) y e) Electroferogramas de la amplificación del fragmento de 218pb correspondiente a *N. ceranae* en muestras de un macho y una obrera, respectivamente.

3.6.2. Prevalencia de *N. ceranae* en abejorros nativos de Uruguay

La prevalencia de *N. ceranae* fue igual o más alta que 50% en las diferentes localidades y en ambos sexos, con la excepción de los machos de *B. atratus* en Montevideo y los machos de *B. bellicosus* en Canelones (Tabla 4, Figura 10).

Tabla 4 – Porcentaje de muestras positivas para *N. ceranae* (prevalencia) y muestras negativas en hembras y machos de *B. atratus* y *B. bellicosus* en las tres localidades analizadas. Los valores de prevalencia igual o mayor al 50 % están señalados en negrita.

		<i>Bombus atratus</i>		<i>Bombus bellicosus</i>	
		Hembras	Machos	Hembras	Machos
Montevideo	Positivo	85% (n=50)	31% (n=19)	-	-
Canelones	Positivo	94% (n=46)	73% (n=41)	50% (n=31)	48% (n=15)
Colonia	Positivo	93% (n=55)	55% (n=18)	77% (n=61)	76% (n=28)

Se encontraron diferencias interespecíficas en la prevalencia entre las localidades estudiadas (*B. atratus*: hembras $\chi^2= 3,400$ P = 0,182, machos $\chi^2= 20,81$ P<0,001; *B. bellicosus*: hembras $\chi^2= 11,347$ P<0,001, machos $\chi^2=5,403$ P = 0,02) por lo cual el análisis posterior de los datos se realizó para cada localidad por separado.

La prevalencia de *N. ceranae* en *B. atratus* fue mayor en las hembras que en los machos en todas las localidades (Montevideo: $\chi^2= 35,257$ P<0,001; Canelones: $\chi^2= 7,856$, P = 0.005; Colonia: $\chi^2= 19,317$, P<0,001) mientras que en *B. bellicosus* no hubieron diferencias entre sexos (Canelones: $\chi^2= 0,022$, P = 0,882; Colonia: $\chi^2= 0,033$, P = 0,856) (Figura 8).

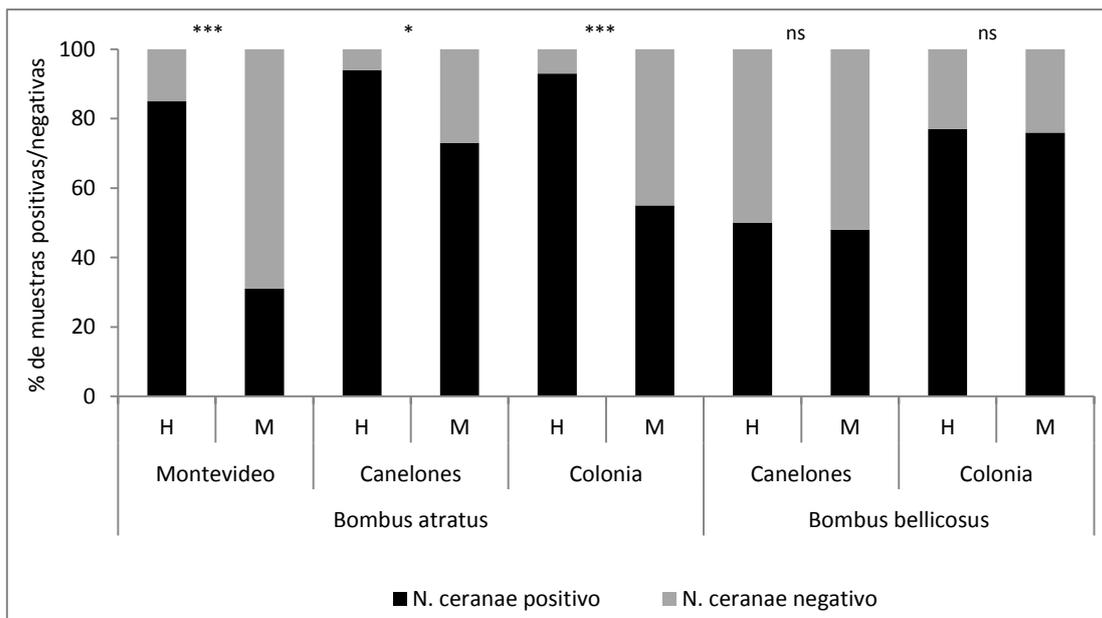


Figura 10 - Porcentaje de muestras *N. ceranae* positivas (prevalencia) analizadas a través de PCR en hembras (H) y machos (M) de *Bombus atratus* y *B. bellicosus* de Montevideo, Canelones y Colonia. Los números dentro de las barras señalan el tamaño de las muestras. En nivel de significancia del test de Chi cuadrado se muestra entre las barras de los pares hembra/macho comparados: *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, ns: no significativo.

La prevalencia en las hembras fue más elevada en *B. atratus* que en *B. bellicosus* en ambos sitios donde las dos especies de abeja estaban presentes (Canelones: $\chi^2=24,799$, $P < 0,001$; Colonia: $\chi^2= 6,456$, $P = 0,011$). Con respecto a los machos, *N. ceranae* fue más prevalente en *B. atratus* en Canelones ($\chi^2= 5,363$, $P = 0,021$) pero no se observaron diferencias interespecíficas en Colonia ($\chi^2= 3,457$, $P = 0,063$).

3.6.3. Intensidad de infección de *N. ceranae* en abejorros nativos de Uruguay

La intensidad de infección fue determinada en 293 muestras positivas para *N. ceranae*. No fue posible analizar microscópicamente la totalidad de las muestras positivas (N=364) debido a no contar con material suficiente en 71 de las muestras luego de los análisis moleculares. La Tabla 5 resume el número de muestras analizadas por localidad, especie y sexo.

Tabla 5.- Número de muestras *N. ceranae* positivas por localidad, especie y sexo utilizadas para el conteo de esporas. Los números entre paréntesis corresponden al número total de muestras positivas por grupo analizado.

	<i>B. atratus</i>			<i>B. bellicosus</i>		
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Total
Montevideo	44 (50)	14 (19)	58	-	-	-
Canelones	24 (46)	40 (41)	64	23 (31)	10 (15)	33
Colonia	49 (55)	16 (18)	65	47 (61)	26 (28)	73

Las esporas fueron detectadas en 246 muestras (84%). La intensidad de infección varió ampliamente, alcanzando cargas tan altas como 44 millones de esporas por individuo, aunque fueron pocos los abejorros que presentaron una carga muy alta (más de 10 millones de esporas por abejorro). En las restantes 47 muestras (16%) las esporas no pudieron ser detectadas microscópicamente, indicando que el número de esporas estaba por debajo del límite de detección establecido (12.500 esporas por abejorro).

La intensidad de infección varió entre sexos, siendo más alta en las hembras que en los machos en ambas especies de abejorros (*B. atratus*: Montevideo: $U=133$, $P<0,001$; Canelones: $U=733,5$, $P<0,001$; Colonia: $U=164,5$, $P<0,001$. *B. bellicosus*: Canelones: $U=11$, $P<0,001$; Colonia: $U=365,5$, $P<0,005$) (Figura 10).

Se encontraron diferencias interespecíficas en la intensidad de infección entre los machos en Canelones, siendo *B. atratus* la especie más infectada ($U=57,5$, $P<0,001$) aunque el tamaño de la muestra de *B. bellicosus* fue pequeño. En Colonia hubieron diferencias entre las hembras presentando también *B. atratus* una intensidad de infección mayor ($U=915$, $P=0,042$). No hubieron diferencias en la intensidad de infección entre las hembras de ambas especies en Canelones ($U=314,5$, $P=0,209$) o entre los machos en Colonia ($U=227,5$, $P=0,312$).

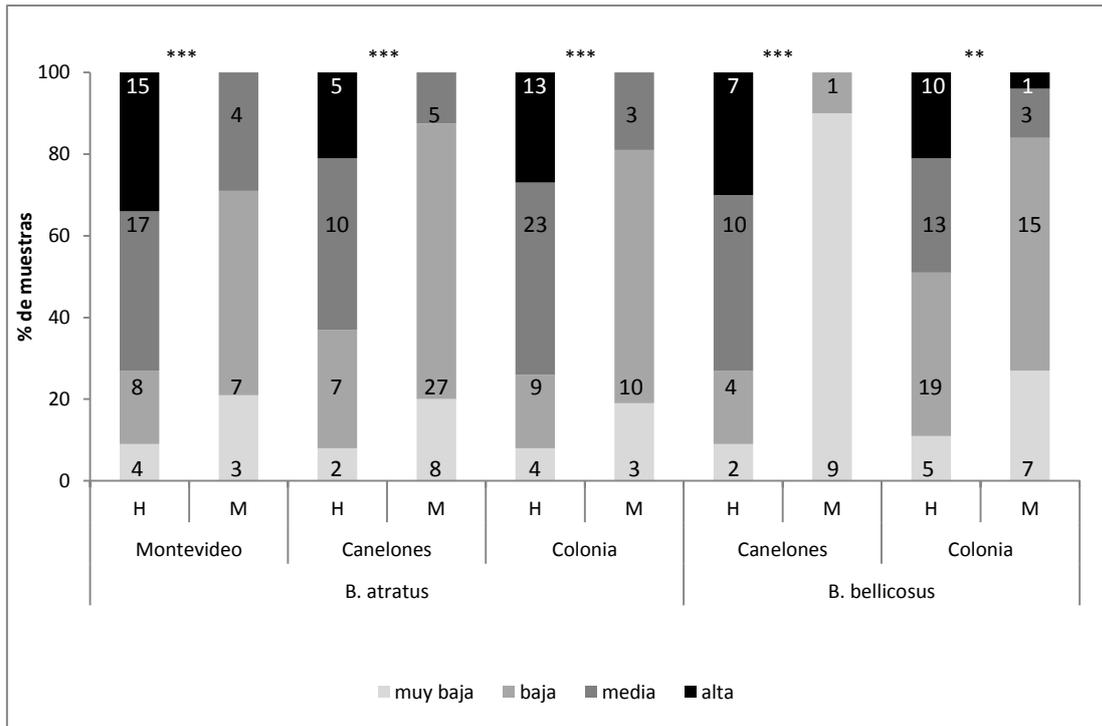


Figura 10 - Distribución de frecuencias relativas de la intensidad de infección de *N. ceranae* en hembras (H) y machos (M) de *Bombus atratus* y *B. bellicosus* en Montevideo, Canelones y Colonia. Los números dentro de las barras corresponden al tamaño de la muestra. En este análisis se incluyeron 293 muestras *N. ceranae* positivas debido a que no todas las muestras positivas (N=364) pudieron ser analizadas microscópicamente. Las categorías fueron definidas de la siguiente manera: muy baja (< 12.500 esporas), baja (de 12.500 a 5×10^5 esporas), media (de $5 \times 10^5 + 1$ a 25×10^5 esporas) y alta (> 25×10^5 esporas). El nivel de significancia para el test de Mann-Whitney se muestra entre las barras de los pares hembra/macho comparados: **: P<0,005, ***: P<0,001, ns: no significativo.

3.6.4. Análisis de las células epiteliales del intestino de los abejorros

En el tubo digestivo de algunos ejemplares de abejorros se observó una gran cantidad de esporas de *Nosema*. Algunas esporas se encontraban dispersas, tratándose probablemente de esporas contenidas en la luz del tubo digestivo, mientras otras esporas se observan agregadas y al parecer altamente empaquetadas dentro de alguna estructura (Figura 11).

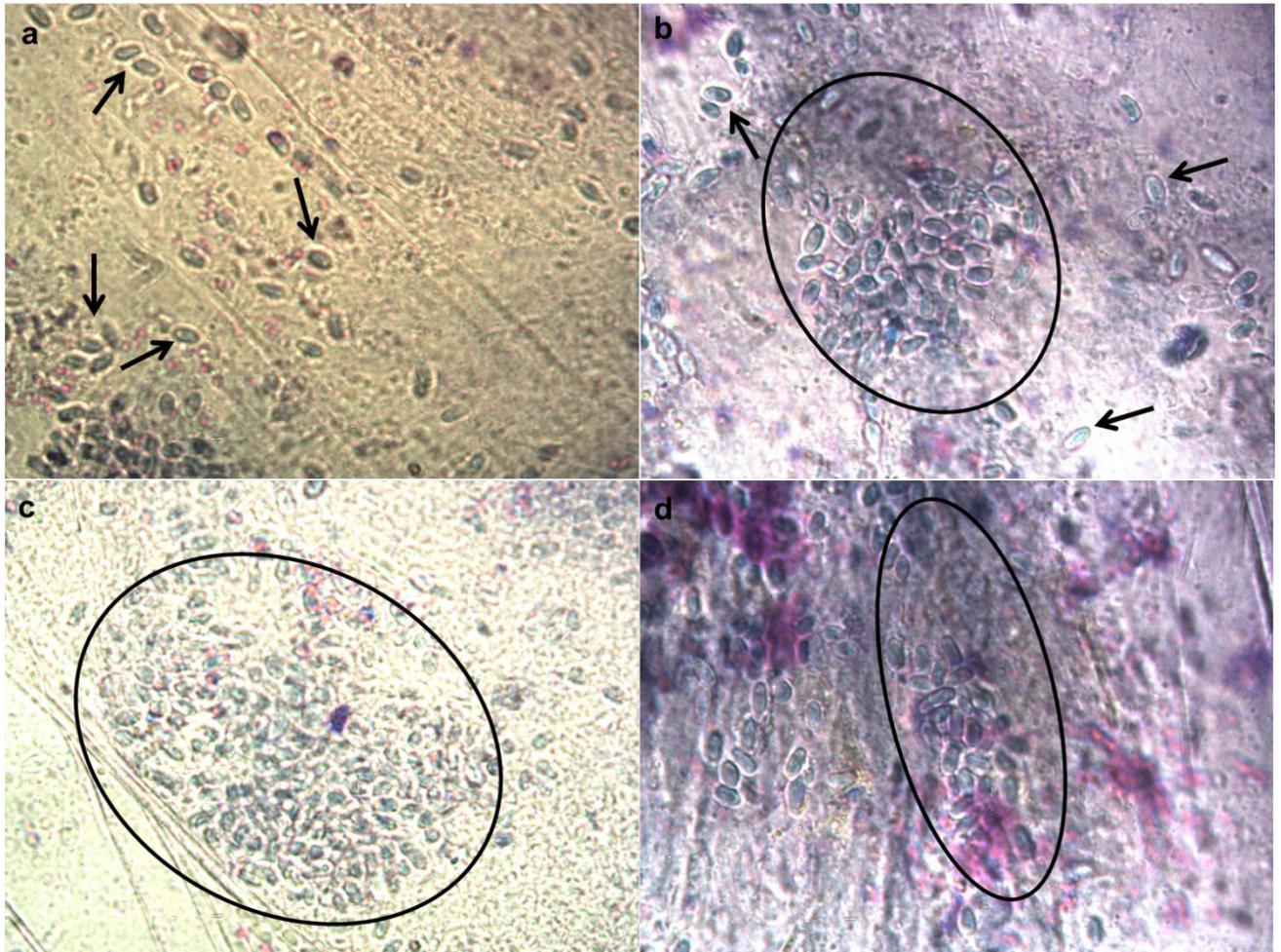


Figura 11 – Preparados del tubo digestivo de abejorros donde se observan esporas de *Nosema* teñidas de azul con solución Giemsa al 10%. a) Esporas de *Nosema* mayoritariamente dispersas. b), c) y d) Esporas de *Nosema* principalmente aglomeradas. Las flechas indican esporas dispersas y los óvalos encierran zonas de aglomeración.

3.6.5. Análisis del gen que codifica para PTP1 de *N. ceranae*

Un fragmento de aproximadamente 808 pb, el tamaño esperado para PTP 1 (Figura 12), fue amplificado en todas las muestras analizadas y las secuencias correspondientes fueron obtenidas exitosamente.

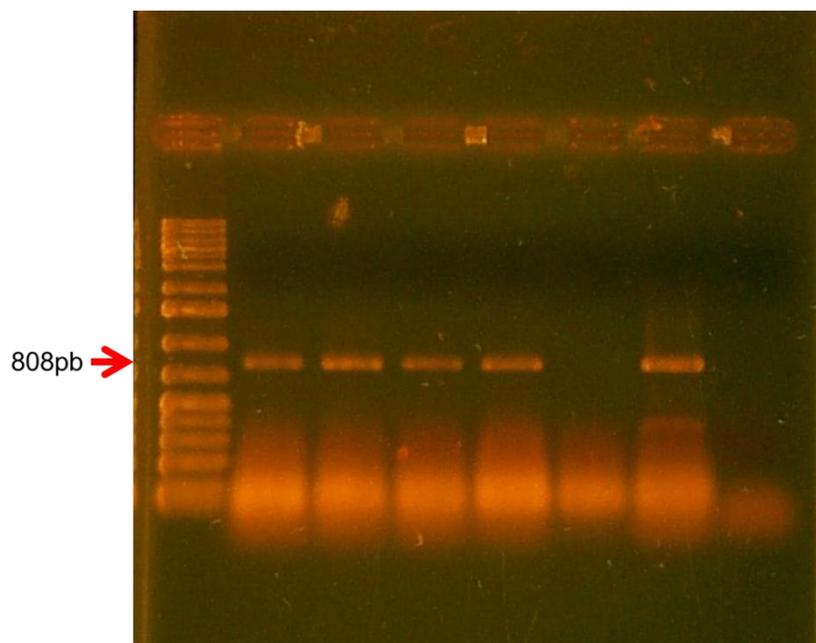


Figura 12 – Amplificación del fragmento de 808pb del gen que codifica para la proteína del tubo polar PTP1 de *N. ceranae* utilizando los primers específicos NcORF 1664-forward y NcORF 1664-reverse. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular y en el séptimo el control negativo. Las muestras fueron obtenidas a partir de macerados abdominales de individuos de *B. atratus*.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con Clustal X (Figura 13). Se encontró un alto nivel de similitud genética entre las secuencias analizadas, encontrándose solamente 24 (4%) bases variables de un total de 572 analizadas.

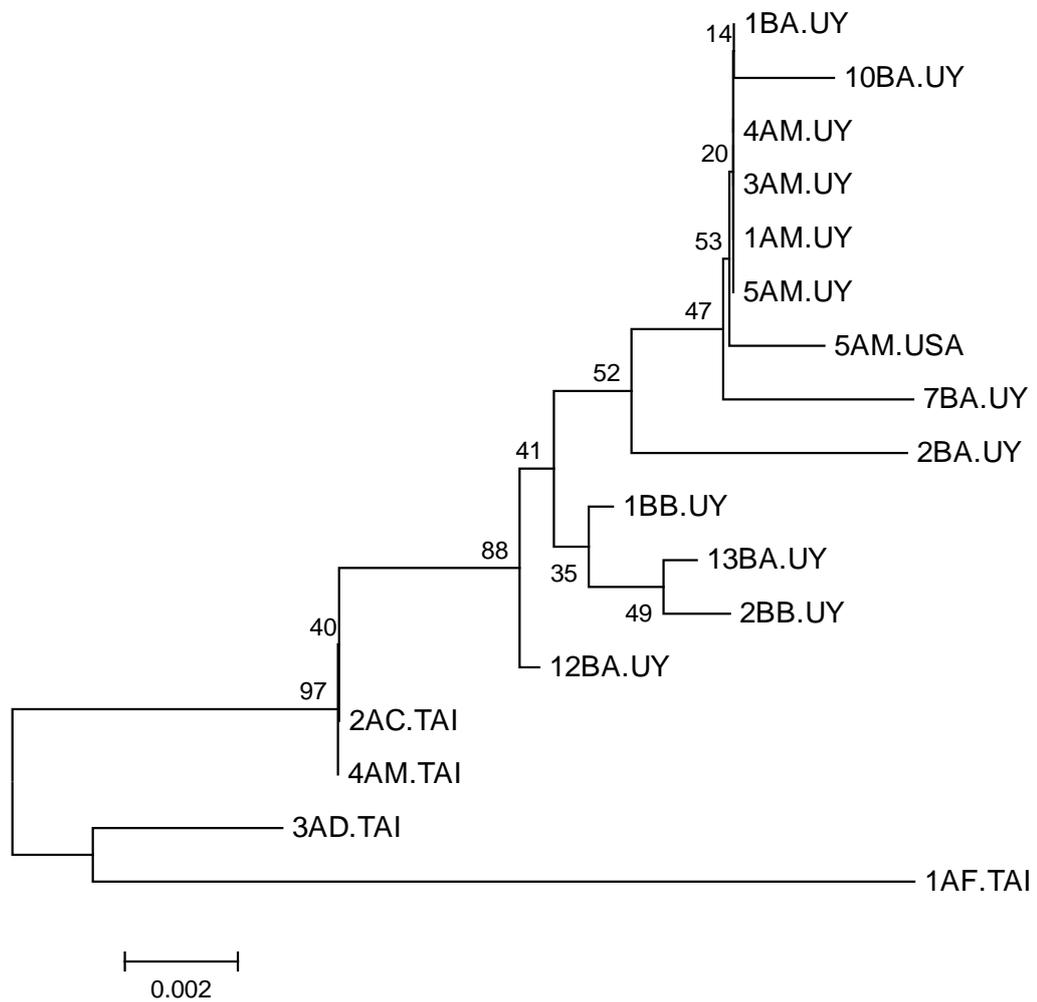


Figura 14 – Análisis filogenético de *N. ceranae* basado en el gen que codifica para la PTP1 a partir de aislamientos provenientes de *Bombus atratus* (BA.UY), *B. bellicosus* (BB.UY) y *Apis mellifera* (AM.UY) de Uruguay, de *A. mellifera* (AM.USA) de EEUU, y de *A. mellifera* (AM.TAI), *A. ceranae* (AC.TAI), *A. florea* (AF.TAI) y *A. dorsata* (AD.TAI) de Tailandia.

3.7. DISCUSIÓN

El principal resultado obtenido en este estudio es que *N. ceranae* se encuentra presente y con una importante prevalencia en los abejorros nativos *B. atratus* y *B. bellicosus* en Uruguay. Además, se establece la ausencia en las muestras analizadas de las otras dos especies de microsporidio buscadas, *N. apis* y *N. bombi*. Teniendo en cuenta que la industria apícola tiene un desarrollo importante en Uruguay y que *N. ceranae* en *A. mellifera* está ampliamente distribuido en el país desde los 90 (Invernizzi *et al.* 2009, Anido *et al.* 2015), un escenario factible es que los abejorros hayan adquirido esporas a través del contacto cercano con las abejas melíferas, tal como sugirieron Plischuk *et al.* (2009) y Graystock *et al.* (2013). Estos resultados confirman las primeras dos hipótesis del estudio, *N. ceranae* es la única especie del género que parasita a los abejorros *B. atratus* y *B. bellicosus* en Uruguay, y este microsporidio se encuentra ampliamente distribuido en estas poblaciones.

La confirmación de que *B. terrestris* es realmente infectado por *N. ceranae* (Graystock *et al.* 2013, Furst *et al.* 2014) junto con la observación de Plischuk *et al.* (2009) de lesiones macroscópicas similares a las encontradas en abejas melíferas infectadas en el ventrículo de abejorros de las mismas especies analizadas en este estudio, sugieren que *B. atratus* y *B. bellicosus* son hospederos genuinos de este parásito. En este trabajo al analizar el epitelio ventricular de los abejorros, se encontraron esporas altamente empaquetadas que indicarían que *N. ceranae* los infecta efectivamente ya que se reproduce dentro de las células epiteliales del intestino. El elevado nivel de infección registrado en muchos ejemplares apoya la idea de que efectivamente *N. ceranae* infecta a los abejorros, ya que difícilmente el alto número de esporas sea adquirido pasivamente por los insectos. Estos hallazgos confirman la hipótesis planteada en cuanto a que los abejorros son efectivamente infectados por *N. ceranae*, descartando que se traten de hospederos accidentales.

Los datos disponibles acerca de los efectos de la infección de *N. ceranae* en abejorros, aunque restringidos a *B. terrestris*, son alarmantes. Parecería ser un patógeno altamente virulento, causando la muerte de la mitad de los individuos infectados en una semana luego de la infección y reduciendo rápidamente la supervivencia de los abejorros, además de tener efectos sub-

letales sobre el comportamiento (Graystock *et al.* 2013). Teniendo esto en cuenta, la alta prevalencia e intensidad de infección de *N. ceranae* encontradas en las poblaciones de *B. atratus* y *B. bellicosus* es preocupante.

3.7.1. Prevalencia de *Nosema ceranae*

Los valores promedio de la prevalencia de *N. ceranae* encontrados en *B. atratus* y *B. bellicosus* (72 % y 63 %, respectivamente) son mucho más elevados que los reportados en otros países para las mismas especies (Plischuk *et al.* 2009) o para otras especies de abejorro (Li *et al.* 2012, Graystock *et al.* 2013, Fürst *et al.* 2014). La alta prevalencia encontrada en este estudio podría reflejar la rápida propagación de una invasión reciente de *N. ceranae* en los abejorros uruguayos. No obstante, una alta prevalencia no significa necesariamente que esté ocurriendo una epizootia (Cordes *et al.* 2012) y alternativamente, *B. atratus* y *B. bellicosus* podrían ser reservorios naturales del patógeno pudiendo soportar altas poblaciones de *N. ceranae*.

Datos adicionales sobre la prevalencia de *N. ceranae* en abejorros de Uruguay sugerirían que la muy alta prevalencia observada para el año 2010 podría tratarse de un evento particular de esa temporada. Por un lado, en muestras de abejorros (obreras) recolectados en marzo y abril de 2009 en siete localidades de Uruguay, se observó una prevalencia promedio de microsporidios de 43% para *B. atratus* (N= 175), con tres localidades superando el 50% de prevalencia, y 14,5 % para *B. bellicosus* (N= 62) (presente sólo en dos localidades) (datos sin publicar). Estas muestras fueron obtenidas utilizando el mismo método de macerado de los abejorros que se utilizó aquí. En la mayoría de las muestras la presencia de microsporidios fue determinada únicamente mediante observación de esporas al microscopio. En unas pocas muestras, se realizaron análisis moleculares para determinar presencia de *N. apis*, *N. bombi* y *N. ceranae*, constatándose la presencia únicamente de *N. ceranae* (Arbulo *et al.* 2011). Por otro lado, S. Plischuk (com. pers.) encontró una prevalencia promedio de 18,2 % en *B. atratus* (N=285) y 44,9 % en *B. bellicosus* (N=118) para muestras de obreras, macho y reinas recolectados en la temporada 2012-2013 en seis localidades de Uruguay. Si se excluye de los análisis a las reinas, debido a que se trata en su mayoría de reinas recolectadas en primavera de 2012 que podrían encontrarse por tanto

en un momento de la infección diferente al resto de los abejorros analizados, los valores de prevalencia son levemente mayores siendo 26,2 % en *B. atratus* (N=191) y 45 % en *B. bellicosus* (N=113). Este aumento de prevalencia se observa más marcadamente en *B. atratus* en donde el número de reinas analizadas fue elevado (N=94). Cabe señalar además que en ambos estudios referidos, los datos de prevalencia podrían estar subestimados ya que fueron calculados en base a la detección de esporas de *Nosema* al microscopio óptico. Como fuese establecido en este estudio, la detección del microsporidio con dicho método no es exacta debido a que en un 16% de muestras positivas por métodos moleculares, las esporas no son detectadas al microscopio. Incluso contemplando una posible subestimación, los valores de prevalencia en las dos temporadas señaladas (2009 y 2012-2013) son inferiores a los reportados aquí. Esto indica que la prevalencia de *N. ceranae* en los abejorros uruguayos no sería característicamente tan elevada como la reportada en la presente investigación sino que podría representar variaciones interanuales. En el mismo sentido, Invernizzi *et al.* (2009) reportan una variabilidad interanual en la cantidad de muestras positivas para *Nosema* sp. (probablemente *N. ceranae*, al menos desde 1990) en *A. mellifera* en Uruguay. En un estudio con muestras representativas de todo el país, se determinó que la prevalencia de *N. ceranae* en abejas melíferas fue de 15% para el año 2010 (Anido *et al.* 2015) inferior a valores reportados para años previos (2007 y anteriores, Invernizzi *et al.* 2009). Lamentablemente no se cuenta con datos de prevalencia para 2009 y 2011-2012 para poder determinar si el patrón de variación encontrado para abejorros fue similar en *A. mellifera*. Cabe mencionar que los valores de prevalencia en *A. mellifera* son calculados a nivel poblacional (muestras de varias abejas por colmena), o sea que es indicador del número de colonias infectadas y no del número de individuos infectados. Por esta razón, los valores no son directamente comparables con los obtenidos en el presente estudio para los abejorros. El mayor nivel de prevalencia encontrado en los abejorros no puede ser interpretado como que estos son más afectados que las abejas melíferas. Se requieren otros análisis para poder determinar este aspecto.

En cada una de las localidades estudiadas en el presente trabajo, los abejorros fueron recolectados en un único sitio de forrajeo, una pradera de

trébol rojo. Aunque no se realizó un relevamiento específico de las especies vegetales disponibles, no se observaron en las cercanías de las áreas muestreadas otras zonas de alta concentración de recursos como los sitios utilizados. Esto hace suponer que las praderas de trébol rojo eran un parche muy recompensante para los abejorros en el área y por tanto concentraban las visitas de muchas pecoreadoras. Como estrategia de forrajeo, los abejorros tienden a especializarse en la especie vegetal que le sea más rentable, es decir, en la que obtenga una mayor recompensa alimenticia neta con el menor costo de tiempo y energía (Heinrich 2004, Goulson 2003). La existencia de grandes parches que concentran recursos como resultado del cultivo, sumado a un gran número de flores disponibles en el área (inflorescencias formadas por numerosas flores) y a una alta producción diaria de néctar asociada a sus corolas tubulares profundas, hacen del trébol rojo un recurso potencialmente muy rentable para los abejorros. De hecho, el trébol rojo es muy utilizado por los abejorros en nuestro país incluso cuando está mezclado con otras especies vegetales (Arbulo 2009, Salvarrey 2009). Un dato que refuerza la idea de que el trébol rojo era un recurso muy utilizado en el área de estudio, al menos para la localidad La Estanzuela, es que en varios nidos de abejorros ubicados en cajones al costado de la pradera de trébol, el 50% del polen y el 98% néctar almacenado a fines de marzo-principio de abril era de trébol rojo (Salvarrey 2012). Una alta frecuencia de visitas en la pradera de trébol rojo puede haber provocado que un gran número de flores estuviese contaminado con *N. ceranae* convirtiéndose en un sitio de importante dispersión del parásito. Esto habría facilitado la transmisión de esporas entre los individuos de las poblaciones muestreadas y por tanto pudo haber influido en la alta prevalencia de *N. ceranae* encontrada en 2010. Recientemente ha sido comprobado que los abejorros pueden actuar como vectores de parásitos, entre ellos *N. ceranae*, depositándolos y transportándolos entre las flores (Goulson & Hughes 2015). Aunque son necesarios otros análisis para confirmar que los resultados pudieron ser producto del método de muestreo de los abejorros, este es un factor a tener en cuenta en estudios subsiguientes.

Por otro lado, las interacciones parásito-hospedero son muy complejas y son influidas por una gran variedad de factores entre los que se encuentran las

condiciones ambientales (temperatura, humedad, disponibilidad de alimento, etc.) que pueden alterar de manera dramática el resultado de una infección (Lazzaro & Little 2009, Schmid-Hempel 2011). En este sentido, cabe mencionar que durante 2008-2009 Uruguay soportó una gran sequía en gran parte del territorio nacional que se extendió hasta fines de 2009 con importantes consecuencias negativas en diversos sectores agropecuarios. Una de los efectos más evidentes de una sequía son las consecuencias sobre la vegetación que pueden llevar a una importante disminución en la disponibilidad de recursos alimenticios (polen y néctar) para los ápidos causándoles deficiencias nutricionales. Una mala nutrición determinada tanto por la cantidad como por la calidad del alimento consumido, no solo puede afectar el crecimiento, el desarrollo y la sobrevivencia individual y colonial de abejas melíferas (Brodschneider & Crailsheim 2010) y abejorros (Schmid-Hempel & Schmid-Hempel 1998, Tasei & Aupinel 2008, Sadd 2011), sino que también puede influenciar su resistencia ante otros factores de estrés como parásitos y patógenos (Naug 2009, Vanbergen *et al.* 2013). El estado nutricional del hospedero influye de manera importante en la dinámica de la interacción parásito-hospedero (Schmid-Hempel 2011). Un individuo con una mala nutrición puede ver aumentada su susceptibilidad a los parásitos así como sufrir mayor parasitismo. Al mismo tiempo, la nutrición del hospedero puede afectar el crecimiento individual y poblacional de un parásito, influyendo también en su transmisión (Logan *et al.* 2004). Existen diversos estudios tanto en abejas melíferas como abejorros que evidencian los efectos de la disponibilidad de alimento sobre la respuesta inmune (Alaux *et al.* 2010, Basualdo *et al.* 2014; König & Schmid-Hempel 1995, Moret & Schmid-Hempel 2000, Tyler *et al.* 2006, Brunner *et al.* 2014) y la tolerancia a parásitos (Porrini *et al.* 2011, Di Pasquale *et al.* 2013, Basualdo *et al.* 2014; Brown *et al.* 2000). La respuesta inmune de los abejorros parecería estar limitada energéticamente dado que su activación aumenta el consumo de energía (Tyler *et al.* 2006), provoca una menor supervivencia de los individuos bajo condiciones limitadas de energía (Moret & Schmid-Hempel 2000) y es más débil en individuos que realizan actividades energéticamente muy costosas como los vuelos de forrajeo (König & Schmid-Hempel 1995). La disponibilidad de polen también afecta la respuesta inmune ya que su expresión frente a una infección (*B. terrestris*-

Crithidia bombi) se ve fuertemente disminuida en abejorros privados de polen (Brunner *et al.* 2014). La limitación de polen disminuye además la variabilidad en la respuesta entre los individuos y Brunner *et al.* (2014) sugieren que esta homogeneización de la población, podría reducir las ventajas de la variabilidad genética existente. En las abejas melíferas, son varios los estudios que demuestran que no sólo la cantidad del alimento proteico es importante, sino también la diversidad (origen botánico diferente), la calidad (porcentaje de los diferentes nutrientes que componen el polen, no solo de la proteína cruda) y la identidad (debido a propiedades inherentes a su composición) del mismo (Alaux *et al.* 2010, Di Pascuale *et al.* 2013, Antúnez *et al.* 2015). Estos aspectos probablemente sean también importantes en abejorros en los que se han encontrado diferencias en el crecimiento larval asociadas a la diversidad del polen consumido (Tasei & Aupinel 2008). Como se mencionó previamente, el estado nutricional del hospedero puede influir también sobre el crecimiento del parásito. Para el sistema *B.terrestris*-*C.bombi*, se ha encontrado que los abejorros privados de polen mantienen una cantidad significativamente menor de parásitos (Logan *et al.* 2004). No obstante, se ha constatado que la virulencia (los efectos del parásito sobre el fitness del hospedero) de *C.bombi* es contexto-dependiente, teniendo efectos más dramáticos en abejorros privados de alimento (Brown *et al.* 2000). Por lo tanto, aunque la carga de parásitos sea menor en condiciones de baja disponibilidad de alimento, las consecuencias de la infección serían más severas. En el mismo sentido, *N. ceranae* se desarrolla rápidamente y alcanza niveles de infección mayores en *A. mellifera* cuando los individuos son alimentados con polen natural en relación a otras dietas (sustitutos comerciales, dieta energética únicamente), evidenciando la interrelación entre la nutrición del hospedero y el desarrollo del parásito (Porrini *et al.* 2011, Basualdo *et al.* 2014). Sin embargo, la sobrevivencia de las abejas es al mismo tiempo mayor indicando que calidad del alimento afecta la tolerancia al parásito (Porrini *et al.* 2011, Basualdo *et al.* 2014). Adicionalmente, en condiciones de campo, colonias que se alimentan de polen más diverso tienen menos carga de *N. ceranae* (y otros patógenos) que aquellas que se alimentan de unas pocas especies vegetales (Invernizzi *et al.* 2011, Antúnez *et al.* 2015).

Lo expuesto muestra la importancia de la nutrición en la interacción parásito-hospedero y lo compleja que puede ser la relación entre estas variables pudiendo incluso tener resultados poco intuitivos debido a una triple interacción entre la disponibilidad de alimento, el genotipo del hospedero y el genotipo del parásito (Sadd 2011). Las condiciones asociadas a la sequía que afectó al país en 2008-2009 pueden haber afectado a las poblaciones estudiadas de abejorros y a sus parásitos. Un estudio realizado durante 2009 y 2010 en colonias de *A. mellifera* emplazadas en Colonia y Canelones, evidencia una menor disponibilidad de recursos florales durante 2009 asociada a la mencionada sequía (Antúnez *et al.* 2013). Los autores encontraron que la diversidad de recursos botánicos utilizados, la cantidad de polen recolectado y la cantidad de miel almacenada a setiembre, fue menor en 2009. A pesar de que las condiciones ambientales durante 2010 eran más favorables, el ciclo de las colonias a las que pertenecían los abejorros utilizados en el presente estudio inició en 2009. La limitada cantidad y/o calidad de recursos alimenticios disponibles para los abejorros en el momento de establecimiento y crecimiento inicial de las colonias durante la primavera de 2009, pudo ocasionar deficiencias nutricionales que afectaron el crecimiento y desarrollo individual y colonial resultando en colonias más débiles y vulnerables a la incidencia de parásitos y patógenos facilitando una posterior transmisión de los mismos durante el resto del ciclo.

3.7.2. Intensidad de infección de *N. ceranae*

El número de esporas observadas al microscopio en muestras positivas para *N. ceranae* por PCR, varió de cero a $44,5 \times 10^6$ por abejorro. Es poco probable que el elevado número de esporas encontradas en muchos individuos sea producto del transporte incidental de las mismas. Además, el rango de variación es similar al encontrado en poblaciones naturales de *B. terrestris* infectadas con *N. bombi*, patógeno original de abejorros (rango: $0 - 74,27 \times 10^6$ esporas/abejorro, Huth-Schwarz *et al.* 2012). Esto reforzaría la idea de que *B. atratus* y *B. bellicosus* son efectivamente infectados por *N. ceranae*, que lograría reproducirse con éxito en ambas especies.

En *B. terrestris* las esporas de *N. ceranae* son detectables al microscopio entre 4 y 7 días luego de la infección experimental y la cantidad de

esporas aumenta considerablemente hacia los 14 días post-infección (constatado en una pequeña porción del intestino) (Graystock *et al.* 2014). Los ejemplares en los que no fue posible detectar esporas microscópicamente (16%) a pesar de haber resultado positivos por PCR, probablemente correspondían a individuos recientemente infectados con *N. ceranae* en los cuales la producción de esporas aun no era evidente.

Es importante mencionar que recientemente Plischuk *et al.* (2015) describieron otra especie de microsporidio para *B. atratus* en Argentina, *Tubulinoosema pampeana*, cuya presencia fue corroborada en muestras uruguayas de *B. atratus* y *B. bellicosus* (S. Plischuk com. pers.). Es probable que esta especie estuviera presente en las muestras analizadas en el presente estudio. Interesantemente, de las seis localidades uruguayas estudiadas por Plischuk, *T. pampeana* fue detectado en Canelones, Colonia y Montevideo, las tres localidades estudiadas en el presente estudio. Las esporas de *T. pampeana* son de forma y tamaño similar a las de *N. ceranae* lo que dificultaría su distinción al microscopio óptico para un observador no entrenado (son distinguibles al microscopio de contraste de fases). En el presente estudio, todas las esporas contabilizadas fueron consideradas pertenecientes a *N. ceranae*, la única especie identificada por métodos moleculares.

3.7.3. Diferencias interespecíficas en la interacción con *N. ceranae*

Se encontraron algunas diferencias sitio-específicas en la prevalencia del parásito en los machos de *B. atratus* y en ambos sexos en *B. bellicosus*. Este patrón indica que no todas las poblaciones podrían ser igualmente afectadas y concuerda con la variación sitio-específica en la prevalencia encontrada para otros parásitos en diferentes especies de abejorro (Cordes *et al.* 2012). A pesar de esas diferencias, se pueden hacer algunas observaciones generales.

La infección por parte de parásitos puede estar influida por muchos factores desde el nivel ambiental hasta el genético. Se han reportado diferencias entre especies de abejorro en diferentes parámetros asociados a la infección (prevalencia, nivel de infección, susceptibilidad) para distintos parásitos (ej.: *C. bombi* y *N. bombi*) (Shykoff & Schmid-Hempel 1991, Rutretch & Brown 2008, Cordes *et al.* 2012). En el presente estudio, se encontraron

diferencias interespecíficas en la prevalencia de *N. ceranae* principalmente en las hembras, con *B. atratus* siendo la especie más afectada. Estas diferencias interespecíficas no se encontraron en la intensidad de infección. En ese caso ambas especies tuvieron patrones similares de carga de esporas lo que sugiere que una vez que un abejorro adquiere el parásito, el curso de la infección es similar en ambas especies. Estos resultados confirman la hipótesis de que la prevalencia de *N. ceranae* varía entre las dos especies de abejorros, pero no que esto también ocurra con la intensidad de infección.

Considerando los valores de prevalencia promedio de cada especie (hembras y machos juntos), las diferencias no son significativas aunque se observa un porcentaje levemente mayor de individuos infectados en *B. atratus*. La existencia de susceptibilidad diferencial a *N. ceranae* podría explicar las diferencias interespecíficas en la prevalencia. Diferencias en susceptibilidad entre especies de abejorros han sido sugeridas para diferentes parásitos, incluyendo microsporidios (Shykoff & Schmid-Hempel 1991, Rutretch & Brown 2008, Cordes *et al.* 2012). Rutretch y Brown (2009), comparando otras dos especies simpátricas de abejorros, encontraron que *B. lucorum* es más susceptible a *N. bombi* que *B. terrestris*, pero los efectos del parásito a nivel individual y colonial son más débiles (la virulencia de *N. bombi* es diferente en ambas especies). Estos autores proponen que diferencias en características de la historia de vida entre las especies de abejorros, como la duración del ciclo de vida que determina el momento de producción de sexuales por ejemplo, podrían generar diferencias en la tolerancia al parásito opuestas a las diferencias en susceptibilidad. Una mayor prevalencia no significa necesariamente que la especie hospedera sea más afectada por el parásito e, incluso si fuera más susceptible a la infección, los efectos del parásito sobre el éxito reproductivo del hospedero podrían ser más débiles. En condiciones de laboratorio, el ciclo de cría de *B. bellicosus* (de huevo a adulto) dura aproximadamente una semana menos que el de *B. atratus* (Salvarrey *et al.* 2013) siendo ésta una diferencia importante en la historia de vida entre ambas especies.

Por otro lado, la densidad de los hospederos podría haber influido en el patrón observado de prevalencia. En Uruguay, *B. atratus* usualmente es más abundante y está más ampliamente distribuido que *B. bellicosus* (Santos *et al.*

2013). Su mayor abundancia podría deberse a que posee colonias de mayor tamaño, a una mayor densidad de colonias o a ambos. En insectos sociales, colonias mayores son usualmente más propensas a infecciones por parásitos (Schmid-Hempel, 2011). Además, se ha encontrado que la densidad de las colonias está correlacionada positivamente con la infección por parásitos en poblaciones naturales de abejorros (Huth-Schwarz *et al.* 2012) y en instalaciones de cría comercial (Colla *et al.* 2006, Meeus *et al.* 2011). La mayor prevalencia encontrada en *B. atratus* podría ser simplemente debido a un mayor número de posibles hospederos. En Colonia, donde solo se observaron diferencias interespecíficas en las hembras, la prevalencia de *N. ceranae* en *B. bellicosus* fue mayor que en Canelones para ambos sexos y esto pudo enmascarar posibles diferencias entre los machos de ambas especies. Interesantemente, *B. bellicosus* a menudo ha sido encontrado en mayor densidad en Colonia que en otras zonas estudiadas lo que podría explicar la mayor prevalencia de *N. ceranae* observada en esta localidad.

La tendencia en las diferencias interespecíficas observada en 2010, se encontró también en 2009 donde la diferencia se acentúa más, siendo la prevalencia en *B. bellicosus* bastante menor que en *B. atratus*. Por otro lado, los datos obtenidos por Plischuk (com. pers.) en 2012-2013, muestran una mayor prevalencia de *N. ceranae* en *B. bellicosus*. Estos datos señalan una vez más la complejidad de las interacciones parásito hospedero que dificultan una generalización, especialmente trabajando con datos de campo.

Para verificar si hay diferencias en la susceptibilidad a *N. ceranae* entre *B. atratus* y *B. bellicosus* habría que realizar experimentos controlados con ejemplares obtenidos mediante cría artificial.

3.7.4. Diferencias entre sexos en la infección de *N. ceranae*

La prevalencia fue menor en los machos que en las hembras en *B. atratus* pero en *B. bellicosus* la proporción de individuos infectados fue similar en ambos sexos. De esta manera no fue confirmada la hipótesis de que la prevalencia varía entre sexos en ambas especies de abejorros. Esto sugiere que la interacción parásito-hospedero entre los abejorros y *N. ceranae* podría ser diferente para las dos especies de abejorro estudiadas. A nivel de la

colonia, los parásitos pueden tener efectos diversos incluyendo cambios en el tamaño, en la supervivencia y en otros parámetros del éxito reproductivo como el número de machos y nuevas reinas producidos. Como se mencionó previamente, un mismo parásito puede tener efectos distintos sobre diferentes especies hospederas (Rutretch & Brown 2009). Se ha encontrado que *N. bombi* afecta de forma importante la producción de sexuales en *B. terrestris* (Otti & Schmid-Hempel 2007, 2008) pero no en *B. lucorum* (Rutretch & Brown 2009). Las colonias incluso podrían responder a la infección produciendo más reproductores como fue encontrado en colonias de *B. terrestris* co-infectadas por *N. bombi* y *C. bombi* (Imhoof & Schmid-Hempel 1999). Efectos diferentes de *N. ceranae* sobre la producción de machos en colonias infectadas de *B. atratus* y *B. bellicosus* podrían explicar las diferencias observadas en los patrones de prevalencia en cada especie.

Por otro lado, la intensidad de infección fue más baja en los machos que en las hembras en ambas especies de abejorro confirmándose la hipótesis planteada de diferencias entre los sexos en este parámetro. Diferencias asociadas al sexo en la infección por parásitos con los machos siendo típicamente más afectados que las hembras es un patrón bien extendido en los diferentes grupos animales (Schmid-Hempel 2011). Entre las explicaciones para esta tendencia se encuentran aspectos relacionados a la selección sexual, con los machos invirtiendo más en características sexuales que limitan el mantenimiento de un sistema inmune costoso (Schmid-Hempel 2011). En himenópteros se plantea además, que los machos serían más susceptibles debido a su condición haploide (O'Donnell & Beshers 2004). Estudios de infección experimental en laboratorio con distintos parásitos han fallado en confirmar esta hipótesis de susceptibilidad haploide en abejorros, encontrando que los machos son afectados de forma similar que las hembras (Ruiz-González & Brown 2006, Rutretch & Brown 2009). No obstante, en condiciones de campo los abejorros y en especial los machos, están bajo situaciones más estresantes y probablemente morirían con una infección menor de la que pueden tolerar en condiciones de laboratorio. Los efectos del sexo en condiciones de campo han sido reportados para diversos parásitos en varias especies de abejorros, pero no parecería haber un patrón general (revisado en Ruiz-González & Brown 2006, Gillespie 2010, Huth-Schwarz *et al.* 2012,

Murray *et al.* 2013). Usualmente, una mayor prevalencia en los machos bajo condiciones de campo ha sido interpretada como una mayor susceptibilidad en machos que en hembras (Shykoff & Schmid-Hempel 1991, Gillespie 2010, Huth-Schwarz *et al.* 2012).

Es poco probable que la menor intensidad de infección en los machos observada en el presente estudio refleje una menor susceptibilidad a través de algún tipo de mecanismo de resistencia que prevenga que la infección continúe avanzando. En lugar de esto, la explicación más simple sería que los resultados podrían deberse a que los machos altamente infectados mueren antes o son menos activos y por tanto están sub-representados en las poblaciones. Alternativamente, las diferencias entre machos y hembras podrían estar asociadas a comportamientos diferentes entre los sexos (Murray *et al.* 2013). Los machos de abejorro dejan el nido de forma permanente unos pocos días después de emerger, forrajean para su propio mantenimiento y patrullan grandes áreas en busca de pareja (Goulson 2003). Las hembras que permanecen en el nido llevando a cabo las distintas tareas de aprovisionamiento y mantenimiento del mismo, podrían estar más expuestas a material contaminado con el parásito (e.g. heces, compañeras infectadas, polen y néctar almacenados, flores contaminadas por visitantes previos infectados) y por tanto ser más propensas a ingerir una dosis mayor de esporas que puede aumentar la intensidad de infección. Para *N. bombi* se encontró que el aumento de la cantidad de esporas utilizadas para inocular abejorros, aumenta la intensidad de infección posterior (Rutrecht *et al.* 2007) y para *N. ceranae* en *A. mellifera* ocurre lo mismo (Forsgren & Fries 2010, Porrini *et al.* 2011). Se podría argumentar que las diferencias mencionadas en relación al contacto con material contaminado deberían verse reflejadas además en la prevalencia del parásito, con los machos siendo menos afectados. Sin embargo, para adquirir la infección con *N. ceranae* probablemente sea suficiente una única exposición al inóculo ya sea a través del alimento o del contacto con compañeros contaminados antes de abandonar el nido o en las flores durante el forrajeo para su propio consumo.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta un posible efecto de la edad de los abejorros utilizados. Las obreras recolectadas en el campo representan una

mezcla de individuos de diferentes edades (Heinrich 2004). Al momento de la recolección, se esperaría que el promedio de edad en las obreras fuese bastante mayor que en los machos. Mientras los machos son producidos al final del ciclo de las colonias, las obreras son producidas a lo largo del ciclo, pueden vivir gran parte de la temporada y su producción cesa cuando inicia la de los reproductores (machos y nuevas reinas). Aunque se conoce poco acerca de la transmisión y la dinámica de la infección de *N. ceranae* en abejorros, el nido es probablemente un foco importante de transmisión y por tanto el sitio donde la mayoría de individuos adquiere el parásito, como ocurre para *N. bombi* (Rutrecht *et al.* 2007). De esta forma, la edad podría usarse como indicador del tiempo transcurrido desde la exposición al parásito e inicio de la infección. En las abejas melíferas, la cantidad de esporas de *N. ceranae* producidas aumenta a medida que transcurre el tiempo desde la infección (Highes *et al.* 2007, Forsgren & Fries 2010, Porrini *et al.* 2011). Asumiendo que la dinámica temporal de *N. ceranae* en abejorros es similar a la observada en abejas melíferas, la mayor intensidad de infección encontrada en las obreras de *B. atratus* y *B. bellicosus* en relación a los machos, podría deberse a una mayor probabilidad de incluir individuos en los que el tiempo transcurrido desde la infección es mayor (e.g. obreras de mayor edad).

Finalmente, se debe tener en cuenta la ya mencionada posible presencia de *T. pampeana* en los abejorros analizados. En el relevamiento realizado por Plischuk (com. pers.), aunque el tamaño de las muestras provenientes de machos es pequeño (en algunas localidades inexistente), *T. pampeana* aún no ha sido detectado en este sexo (S. Plischuk com. pers). Si esto fuese reflejo de una infección sesgada hacia las hembras por parte de *T. pampeana*, los resultados de nivel de infección diferencial entre los sexos reportados en el presente estudio podrían ser interpretados de manera diferente. Son necesarios más análisis para dilucidar este tema.

Lo expresado hasta acá muestra que pueden haber distintas explicaciones posibles para los patrones de infección observados en condiciones naturales. Son necesarias investigaciones que incluyan entre otras

cosas ensayos de infección experimental para comprender mejor este complejo sistema parásito-hospedero.

3.7.5. Análisis del gen que codifica para PTP1 de *N. ceranae*

En la última década, diversos estudios han evidenciado un alto grado de diversidad genética en las poblaciones de *N. ceranae* alrededor del mundo. Esa gran variabilidad ha sido encontrada en distintas regiones del genoma del microsporidio analizando secuencias de ADN ribosomal (Huang *et al.* 2008, Sagastume *et al.* 2011, 2013), genes que codifican para diferentes proteínas estructurales (Hatjina *et al.* 2011, Roudel *et al.* 2013, Gómez-Moracho *et al.* 2013, Van der Zee *et al.* 2014, Sagastume *et al.* 2015), e incluso analizando el genoma completo a través del análisis de ISSR (Intergenic Sequence Simple Repetition) (Branchiccela 2014). Para dar cuenta de la alta diversidad genética presente en *N. ceranae* se han planteado varias explicaciones que incluyen la existencia de secuencias con múltiples copias dentro de un mismo núcleo, la heterocigosis en una espora (diplocariónica), la existencia de recombinación genética y de una posible fase de reproducción sexual, y la co-infección de varias cepas del microsporidio incluso en una misma abeja (Sagastume *et al.* 2011, 2014, 2015, Higes *et al.* 2013, Roudel *et al.* 2013, Gómez-Moracho *et al.* 2014, van der Zee *et al.* 2014).

Los efectos de *N. ceranae* sobre las colonias de *A. mellifera* difieren entre distintas regiones geográficas, observándose consecuencias importantes en España (Higes *et al.* 2013) que no se repiten en otros países (Invernizzi *et al.* 2009, Genersch *et al.* 2010, Paxton *et al.* 2010). Para explicar estas diferencias, se ha planteado la existencia de distintas variantes genéticas del microsporidio que podrían diferir en su virulencia (Medici *et al.* 2012, Dussaubat *et al.* 2013, Higes *et al.* 2013, van der Zee *et al.* 2014). La presencia de múltiples copias de varios de los genes utilizados y la gran diversidad genética encontrada en las distintas muestras así como dentro de una misma muestra, han impedido en la mayoría de los trabajos identificar variantes de *N. ceranae* provenientes de diferentes regiones geográficas (Higes *et al.* 2006, Huang *et al.* 2008, Chaimanee *et al.* 2011, Hatjina *et al.* 2011, Sagastume *et al.* 2011, 2013, Roudel *et al.* 2013, Gómez-Moracho *et al.* 2014, Van der Zee *et al.* 2014). Interesantemente, Sagastume *et al.* (2015) estudiando muestras de Australia y

Europa no diferenciaron variantes asociadas al origen geográfico pero encontraron una mayor proporción de genotipos mezclados (heterocigosis) en los aislamientos provenientes de Europa. Los autores proponen que esa heterogeneidad, caracterizada por la coexistencia mantenida de alelos diferentes, podría ser la explicación de la gran virulencia de *N. ceranae* en *A. mellifera* (Sagastume *et al.* 2015). Por otro lado, Branchiccela (2014) estudiando la diversidad de todo el genoma mediante el análisis de Inter Regiones de Repetición Simple (ISSR) como alternativa a la secuenciación, pudo obtener evidencias de diferenciación de variantes. A partir de muestras de orígenes geográficos diferentes, a pesar de encontrar un alto nivel de variabilidad, consiguió distinguir claramente tres grupos que asocian muestras de países alejados e interesantemente separa las muestras provenientes de España de las del resto de Europa. La autora plantea que el hecho que muestras provenientes de países lejanos aparezcan agrupadas sería reflejo del comercio internacional de material vivo sin controles sanitarios adecuados. La diferenciación de las muestras de *N. ceranae* de España de las del resto de los países de Europa podría explicar las diferencias encontradas en los efectos provocados por la infección de *N. ceranae* entre dichos países (Branchiccela 2014).

Teniendo en cuenta la presencia de múltiples copias de genes ribosomales y estructurales y la gran variabilidad genética, la secuenciación directa de productos de PCR es inapropiada para estudiar relaciones genéticas en *N. ceranae* ya que provee resultados difíciles de interpretar (Sagastume *et al.* 2011, Highes *et al.* 2013). En el mejor de los casos, si se consigue obtener una única secuencia, esta probablemente corresponda a la variante más frecuente o a una secuencia consenso de todas las presentes (Sagastume *et al.* 2011, Highes *et al.* 2013). Debajo de una secuencia consenso probablemente haya diferentes haplotipos a diferente frecuencia. La secuenciación directa de productos de PCR puede pasar por alto numerosas variantes genéticas (haplotipos) que coexisten en una muestra y por tanto subestima los niveles de diversidad (Hatjina *et al.* 2011, Sagastume *et al.* 2011, Gómez-Moracho *et al.* 2013).

En el presente estudio se utilizó el gen que codifica para la proteína del tubo polar 1 (PTP 1). La PTP1 es un componente importante del filamento polar

de *N. ceranae* (Chen *et al.* 2009). El tubo polar es esencial para los microsporidios ya que media la inyección del esporoplasma a la célula hospedera (Xu & Weis 2005) y por tanto, *N. ceranae* podría haber adaptado los componentes del tubo polar para ser más hospedero-específicos. Al igual que en otras regiones del genoma, incluyendo los genes de las otras dos proteínas del tubo polar, se ha encontrado una importante diversidad genética en el gen PTP1 (Branchiccela 2014, Gómez-Moracho *et al.* 2015).

En la mayoría de los trabajos mencionados, en los que se analiza la diversidad genética de *N. ceranae*, se han utilizados únicamente aislamientos obtenidos de *A. mellifera*. Unos pocos han incluido muestra procedentes de otras especies hospederas y siempre han sido pertenecientes al género *Apis* (Chaimanee *et al.* 2011, Roudel *et al.* 2013, Sagastume *et al.* 2015, Gómez-Moracho *et al.* 2015). Los resultados han sido contradictorios. Por una lado, Roudel *et al.* (2013) y Sagastume *et al.* (2015) no encontraron diferencias entre aislamientos obtenidos de *A. mellifera* y *A. cerana*, sugiriendo que existe libre transmisión del microsporidio de un hospedero al otro. En el caso de Chaimanee *et al.* (2015), utilizando el gen que codifica para PTP1 los autores encuentran una diferenciación entre las variantes presentes en *A. mellifera*-*A. cerana*, *A. florea* y *A. dorsata* pero los resultados deben ser interpretados con cautela ya que la secuenciación se realizó directamente a los productos de PCR. Por otro lado, Gómez-Moracho *et al.* (2015), analizando la estructura poblacional en base a la variación en los genes que codifican para PTP1, PTP2 y PTP3, encontraron evidencia de una incipiente pero significativa diferenciación entre las poblaciones de *N. ceranae* presentes en *A. mellifera*, *A. cerana* y *A. florea*. Interesantemente, los dos trabajos que logran diferenciar aislamientos provenientes de diferentes especies hospederas lo hacen en base al análisis de genes que codifican para las proteínas del tubo polar del microsporidio.

En el presente estudio, se encontró que los aislamientos provenientes de *B. atratus*, *B. bellicosus* y *A. mellifera* de Uruguay y EEUU son similares. Debido a limitantes metodológicas, sería incorrecto decir que este resultado indica una falta de diferencias genéticas significativas en el gen que codifica para PTP1 en *N. ceranae* presente en las diferentes especies hospederas.

Para distintos loci genómicos se ha corroborado que una misma muestra, incluso proveniente de un único individuo, suele contener un conjunto de variantes diferentes pero similares entre sí que suelen variar en unas pocas sustituciones (Gómez-Moracho *et al.* 2013, 2015, Roudel *et al.* 2013, Van der Zee *et al.* 2014). Adicionalmente, aislamientos distintos suelen compartir las variantes más frecuentes en la población (Gómez-Moracho *et al.* 2013, 2015, Roudel *et al.* 2013). Teniendo esto en cuenta, aunque las frecuencias de las variantes fuesen diferentes entre los aislamientos, se esperaría que las secuencias consenso fuesen similares. Los resultados estarían indicando entonces, que las mismas variantes de *N. ceranae* estarían presentes tanto en abejorros como en abejas melíferas. Por lo tanto, no se confirmaría la hipótesis de que las poblaciones de *N. ceranae* que parasitan a *B. atratus* y *B. bellicosus* están más relacionadas entre sí que con las que infectan a *A. mellifera*. Esto apoyaría la sugerencia de que *N. ceranae* se transmitiría libremente entre especies hospederas diferentes (Roudel *et al.* 2013, Sagastume *et al.* 2015, Chaimanee *et al.* 2011). Aunque son necesarios otros análisis para corroborar lo planteado, en este caso las especies hospederas analizadas están más lejanamente emparentadas que las estudiadas anteriormente (Chaimanee *et al.* 2011, Roudel *et al.* 2013, Sagastume *et al.* 2015) y por tanto, los resultados resaltarían la versatilidad de *N. ceranae*, capaz de parasitar géneros de ápidos diferentes sin diferenciación aparente.

Por otro lado, haber encontrado una diferenciación mayor con los aislamientos provenientes de las abejas asiáticas *A. ceranae*, *A. florea* y *A. dorsata*, podría indicar la existencia de alguna variante frecuente diferente a las presentes en las demás especies hospederas. En este sentido, Gómez-Moracho *et al.* (2015) encontraron algunos haplotipos presentes únicamente en *A. ceranae* y/o *A. florea*, en algunos casos con frecuencias superiores a los demás haplotipos. El hecho de que el aislamiento de *A. mellifera* proveniente de Tailandia haya quedado agrupado junto al resto de las muestras tailandesas podría significar que las distintas especies de esa región compartan los mismos haplotipos frecuentes. Lamentablemente, el trabajo de Gómez-Moracho *et al.* 2015 no incluye muestras de *A. mellifera* de Tailandia.

Finalmente, los resultados hallados aportan a la discusión acerca de la expansión de hospederos de *N. ceranae* y sus posibles rutas de propagación.

Desde que *N. ceranae* fue encontrada en *A. mellifera* se asumió que era un parásito emergente reciente y que había saltado desde *A. cerana* (Higes *et al.* 2006, Klee *et al.* 2007), el supuesto hospedero original. El gran número de haplotipos detectados en las poblaciones mundiales de *N. ceranae* en *A. mellifera* que difieren en pocos cambios, la falta de diferenciación entre las poblaciones de orígenes geográficos diferentes al compartir los haplotipos más frecuentes y exceso de variantes de baja frecuencia, indicarían una expansión demográfica reciente a partir de una única población ancestral común (Roudel *et al.* 2013, Gómez-Moracho *et al.* 2013, 2015). La amplia distribución de *N. ceranae* en las abejas melíferas asiáticas y la presencia de *N. ceranae* en abejas melíferas de las Islas Salomón, pero solamente en aquellas que habían sido invadidas por *A. cerana*, serían evidencia de un origen asiático del microsporidio (Botías *et al.* 2012). Una mayor diversidad genotípica encontrada en aislamientos australianos en relación a los europeos se interpretan como evidencia adicional de esta hipótesis (Sagastume *et al.* 2015). Sin embargo, estas pruebas ubicarían el origen geográfico de *N. ceranae* en el continente asiático pero no identificarían al hospedero original. El amplio rango de hospederos reportado para *N. ceranae* no ha permitido establecer de forma certera su hospedero original que podría no ser *A. ceranae*. De hecho, indicios de menor diversidad en las poblaciones de *N. ceranae* en *A. cerana* contradeciría la hipótesis de que esta especie es su hospedero original (Gómez-Moracho *et al.* 2015).

Los análisis filogenéticos de *Nosema* sugieren que *N. ceranae* y *N. bombi* están más emparentados entre sí que cualquiera de ellos con *N. apis* (Fries *et al.* 2001, Wang *et al.* 2006, Chen *et al.* 2009, Shafer *et al.* 2009, Li *et al.* 2011). Li *et al.* (2011) detectaron una gran diversidad de taxones de *Nosema*, incluyendo *N. ceranae*, en abejorros en China y establecen que esto es consistente con la hipótesis de que el género *Nosema* pudo haber diversificado cerca del centro de origen de *Bombus*, que ha sido propuesto en China. Estudiando la cofilogenia de abejas (*A. mellifera*, *A. ceranae*, *Bombus* spp) y sus microsporidios (*N. apis*, *N. ceranae*, *N. bombi*), Shafer *et al.* 2009, proponen dos posibles hipótesis evolutivas para estos sistemas parásito-hospedero. Una implica un ancestro de *N. bombi* que habría saltado desde *Bombus* a *A. cerana*; la otra sugiere un ancestro de *N. ceranae* saltando de

hospedero hacia *Bombus*. En cualquier escenario, *N. ceranae* podría haber estado presente en abejorros antes incluso que *N. bombi* y este último ser una especialización posterior del parásito. Por lo tanto, el hospedero original de *N. ceranae* podría ser otra especie y los saltos de especies haber ocurrido en otras direcciones. Si *N. ceranae* estuvo presente primero en abejorros y luego en *A. mellifera*, o vice versa, es un asunto a ser determinado aún.

Considerando que se utilizó la secuenciación directa de los productos de PCR además de analizar únicamente un fragmento de 800pb sin considerar variaciones en otros fragmentos del genoma y a que la muestra es pequeña, los resultados obtenidos en el presente estudio deben ser considerados con suma cautela. Sin embargo, a pesar de que los resultados sean reflejo de secuencias consenso del fragmento del gen que codifica para PTP1 en cada una de las especies hospederas analizadas y la variabilidad genética de *N. ceranae* haya quedado enmascarada, las relaciones encontradas señalan la importancia de la inclusión de aislamientos provenientes de diferentes especies hospederas a la hora de analizar las relaciones genéticas en este microsporidio.

En suma, en este primer capítulo de la tesis se encontró que *N. ceranae* parasita los abejorros nativos *B. atratus* y *B. bellicosus*, encontrándose algunas diferencias interespecíficas y entre sexos en la prevalencia y/o la intensidad de infección. Por otro lado, se comparan por primera vez muestras de *N. ceranae* provenientes de abejorros con las obtenidas de *A. mellifera* y los resultados apoyarían la falta de diferenciación entre poblaciones del parásito presentes en especies hospederas diferentes.

4. CAPÍTULO 2

Análisis de hidrocarburos cuticulares para discriminar abejorros *Bombus atratus* de diferentes colonias

4.1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos cuticulares (HCC) forman la capa de lípidos que protege a los insectos de diferentes agentes (deshidratación, abrasión, microorganismos, químicos, etc.) y además sirven como medio para la comunicación, jugando un rol principal en distintos procesos de reconocimiento (Howard & Blomquist 2005, Greene 2010). La existencia de complejos sistemas de reconocimiento es una característica extendida entre los animales que viven en grupo ya que facilita la cooperación entre los miembros del grupo y mantienen la integridad del mismo (Michener 1974, van Zweden & d'Ettore 2010).

En los insectos sociales (hormigas, avispas, abejas y termitas) existen sofisticados sistemas de reconocimiento en base a HCC que permiten distinguir entre especies, sexos, compañeros de colonia y castas (Howard & Blomquist 2005, Greene 2010, van Zweden & d'Ettore 2010). Los HCC son generalmente mezclas muy complejas de distintos compuestos y, dentro de una especie, las abundancias relativas de los componentes difieren entre los distintos grupos de conspecíficos (Howard & Blomquist 2005, Dani 2009). Así, los individuos que pertenecen a una misma colonia comparten un olor común que usualmente consiste en una mezcla específica cuyas proporciones relativas varían entre colonias (Howard & Blomquist 2005). De esta manera, los individuos pueden reconocer a sus compañeros de nido y detectar intrusos.

En la cutícula de los abejorros se pueden encontrar, además de diferentes clases de hidrocarburos, algunos compuestos oxigenados como ésteres, ésteres de ácidos grasos, aldehídos, cetonas y acetatos (Blacher *et al.* 2013, Rottler *et al.* 2013). Los perfiles de los HCC están dominados por alcanos lineales y alquenos de cadena larga (Martin *et al.* 2010, Jarau *et al.* 2012) pero también incluyen metil alcanos ramificados y alcadienos (Blacher *et al.* 2013). La diversidad de isómeros de alquenos producida es inusualmente elevada. Sin embargo, las diferentes especies de abejorros poseen un patrón especie-

específico en el perfil de esos isómeros lo que indicaría un rol importante de estos compuestos en el reconocimiento de especies (Martin *et al.* 2010). Debido a su carácter especie-específico, la variabilidad del perfil de isómeros de alquenos es baja entre individuos. Por otro lado, el perfil de los alcanos suele variar ampliamente entre individuos, tanto entre especies como dentro de la misma especie (Martin *et al.* 2010).

Los perfiles de HCC de abejorros también permiten la discriminación de miembros de una misma colonia (Ayasse *et al.* 1999, Blacher *et al.* 2013, Rottler *et al.* 2013). Como se mencionó anteriormente, las colonias usualmente difieren en las cantidades relativas de determinados compuestos de la mezcla, lo que permitiría la discriminación (Dani 2009). Entre los HCC identificados como importantes para discriminar entre colonias de abejorros se encuentran los alcanos de 21 a 24 carbonos, los alquenos de 27 y 33 carbonos y los alcadienos de entre 30 a 33 carbonos. También se han encontrado otros compuestos con un rol discriminante como algunos ésteres de la cera y algunas cetonas (Ayasse *et al.* 1999, Rottler *et al.* 2013).

En los abejorros, como en todos los insectos sociales, la colonia es la unidad reproductiva y la población efectiva está determinada por el número de colonias presentes en un área más que por el número de individuos (Darvill *et al.* 2004, Knight *et al.* 2005). Para poder determinar la prevalencia, nivel de infección u otro parámetro epidemiológico de un patógeno a nivel poblacional, es necesario tener datos de las distintas colonias que conforman la población de un área determinada. Sin embargo, encontrar nidos de abejorros en la naturaleza es una tarea muy difícil. Al recolectar abejorros durante su actividad de pecoreo, no es posible saber de antemano cuántas colonias están representadas en el conjunto muestreado. Como los recursos florales suelen estar distribuidos en parches (naturales o cultivados), en un determinado sitio con abundancia de recursos, es esperable encontrar individuos de distintas colonias, especialmente de las más cercanas al parche de recursos.

En este estudio se buscará estimar el número de colonias de *B. atratus* del cual provienen los abejorros que se encuentran pecoreando en un parche de recursos florales, mediante el análisis químico de sus hidrocarburos cuticulares.

4.2. HIPÓTESIS

- 1- El perfil de los extractos cuticulares de *B. atratus* varía entre individuos pertenecientes a colonias diferentes.
- 2- El análisis de los perfiles de hidrocarburos cuticulares permite determinar el número de colonias de las cuales provienen los abejorros capturados en el campo durante la actividad de forrajeo.

4.3. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el uso de hidrocarburos cuticulares de abejorros *B. atratus* como indicador de la cantidad de colonias representadas en una muestra de abejorros recolectados durante la actividad de forrajeo.

4.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1-Determinar el perfil de hidrocarburos cuticulares en ejemplares de *B. atratus* capturados en el campo.
- 2-Evaluar si el perfil de hidrocarburos cuticulares de *B. atratus* tiene la capacidad de discriminar a abejorros de diferentes colonias.
- 3-Distinguir colonias representadas en una muestra de obreras de *B. atratus* recolectadas en un área durante la actividad de forrajeo a partir del perfil de hidrocarburos cuticulares.
- 4-Determinar el nivel de prevalencia de *N. ceranae* a nivel poblacional.

4.5. MATERIALES Y MÉTODOS

4.5.1. Preparación de las muestras

La preparación y análisis de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química de la Universidad de la República.

La extracción de compuestos cuticulares se realizó a partir de las 49 obreras de *B. atratus* recolectadas pecoreando sobre trébol rojo en la localidad de Sauce, Canelones, utilizadas para determinar la presencia de *N. ceranae* (Capítulo 1). Para este estudio se utilizaron las partes del cuerpo que no fueron empleadas para el análisis de microsporidios: cabeza y tórax con sus respectivos apéndices. Previo a la extracción de los HCC se retiró de cada individuo el tercer par de patas, poseedor de las corbículas en las hembras, para evitar que el polen que pudiesen contener interfiriera en el análisis. Adicionalmente, se utilizaron 32 obreras obtenidas de 3 colonias conocidas como muestras de referencia (Colonia A: N=10; Colonia B: N=11; Colonia C: N=11; las colonias B y C fueron obtenidas mediante cría artificial de abejorros en laboratorio y las obreras nunca salieron al campo). La presencia de *N. ceranae* se evaluó en estos abejorros mediante microscopía óptica a partir de macerados abdominales preparados con el mismo método descrito en el capítulo 1.

La extracción de los HCC se realizó sumergiendo los fragmentos de cada abejorro en 1 ml de hexano de alta pureza. Se colocaron los viales en un baño de ultrasonido durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego los fragmentos de abejorro se retiraron del solvente. Se corroboró el volumen de los extractos y se agregó solvente hasta llevar a todas las muestras a 1 ml. Posteriormente, a cada muestra se agregaron 50 μ l de una solución de concentración conocida de tridecano como estándar interno. Los viales se sellaron y almacenaron a - 20°C para su posterior análisis.

4.5.2. Análisis químicos

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) (Shimadzu QP 2010 Plus). El GC estaba equipado con una columna DB5 de 0,25 mm de diámetro interno, 30 m de largo

y 0,25 μm de espesor de película de fase estacionaria. El programa de temperaturas utilizado consistió en una temperatura inicial de 70 °C (1 min), luego un aumento hasta 150 °C a 10 °C/min, y posteriormente hasta 300°C a 5 °C/min. La temperatura de la fuente de iones del MS fue de 200°C y el rango de masa/carga de 30-550 m/z. Se inyectó 1 μl de cada muestra (utilizando un inyector automático) en el modo splitless; la temperatura de inyección fue de 250 °C y la presión de 58,8 kPa. Se utilizó helio como gas portador a un flujo en la columna de 0,97 ml/min.

Los compuestos se identificaron en el software GCMSsolution, utilizando las bases de datos NIST05 (Linstrom & Mallard 2005) y SHIM 2205 (Adams 2007), los iones diagnóstico y los índices de Kovats (Adams 2007). Teniendo en cuenta posibles diferencias en los perfiles asociadas al sexo y/o a la infección de *N. ceranae*, para la identificación de compuestos se utilizaron cromatogramas pertenecientes a una hembra infectada y a un macho no infectado. Los picos de estos cromatogramas se integraron definiendo los parámetros cuantitativos de la siguiente manera: pendiente 2000/minuto, ancho 2/segundo, drift 0/minuto, T.DBL 1000 minutos y mínima área/altura 10000.

Dado que la mayoría de los HC eluyeron de la columna con un tiempo de retención mayor a 26 min, y que los picos de tiempos de retención menores correspondían en su mayoría a compuestos oxigenados (ésteres, aldehídos, alcoholes), para los análisis descritos a continuación se utilizaron únicamente los picos de tiempo de retención mayor a 26 min. Los compuestos oxigenados no fueron utilizados debido a que los perfiles de los mismos en las muestras de referencia (muestras del mismo nido) fueron poco informativos

4.5.3. Procesamiento de los datos

Para establecer una eventual correlación entre los perfiles de HC y la pertenencia a una cierta colonia, los cromatogramas obtenidos se procesaron con el software MZmine2 (Pluskal *et al.* 2010). Este programa procesa los datos del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masa (GCMS) permitiendo obtener información acerca de todos los iones detectados en los distintos tiempos de retención para cada muestra. De esta forma se logra una matriz de áreas (medida de cantidad) para todos los iones que conforman cada uno de los compuestos presentes en los diferentes

perfiles. El procesamiento de los cromatogramas implicó los siguientes pasos: 1) filtrado del espectro para reducir la complejidad del mismo y remover posible ruido; 2) detección de los picos, que implica encontrar los picos correspondientes a compuestos o fragmentos de los mismos; 3) alineamiento de los picos entre las corridas de las diferentes muestras; y 4) normalización utilizando el estándar interno para reducir errores sistemáticos ajustando las intensidades dentro de la corrida de cada muestra.

Las matrices de datos obtenidas se procesaron en planillas de cálculo y los análisis se realizaron utilizando los softwares estadísticos PAST y SPSS.

4.5.4. Análisis de los datos

Los perfiles de HCC suelen ser mezclas complejas de entre 20 a 100 compuestos individuales. La gran cantidad de datos que involucra este análisis dificulta la interpretación de las relaciones entre los compuestos y las diferencias entre individuos o colonias. Para reducir la dimensión del conjunto de datos y facilitar el análisis, se utilizaron métodos estadísticos multivariados como el Análisis de Componentes Principales (ACP) y el Análisis Discriminante (AD) que permitieron reducir conjuntos de datos complejos a un único dato para poder relacionarlos con otros similares (Martin & Drijfhout 2009). Con los compuestos y los componentes principales obtenidos se realizaron análisis comparativos y de clasificación entre perfiles provenientes de grupos diferentes de individuos para poder determinar el número de colonias en las muestras de campo.

Se excluyó de los análisis una muestra de la colonia A de referencia, ya que contenía una concentración de compuestos muy superior a todas las demás muestras de referencia.

El análisis del perfil de HCC se realizó con la cantidad total de cada pico por un lado y con la cantidad relativa al total de sustancias por otro, siguiendo los pasos que se describen a continuación. Se utilizaron únicamente los picos presentes en los perfiles de todos los individuos (783 picos de un total de 1029). Para disminuir la varianza, los datos fueron transformados a logaritmo.

Primero se llevó a cabo un ACP con los datos de las muestras de referencia. A partir de los componentes principales computados, se realizó un AD para determinar si el perfil de compuestos muestra variaciones colonia-

específicas, y para identificar aquellos picos que contribuyen más a la discriminación entre colonias. Los picos corresponden a los iones en los que se fragmenta cada compuesto durante el análisis por GCMS y no a las cantidades de cada compuesto en conjunto (área del pico en un cromatograma). Para determinar la importancia de los picos individuales en la discriminación, se usó el coeficiente estandarizado de la función discriminante y los *loadings* ($>|0,05|$) de los componentes principales (CP). Aquellos picos que contribuyeron más a la variación de los perfiles entre colonias fueron analizados para determinar diferencias significativas entre los grupos con el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Posteriormente, se construyó una matriz de datos para todas las muestras (de referencia y de los abejorros recolectados en el campo) solo con los picos identificados como importantes para discriminar entre colonias, y cuyas diferencias entre grupos fueron significativas. Con estos datos se realizó otro análisis de componentes principales y con los componentes principales computados se llevaron a cabo dos procedimientos. Por un lado, como medida de variabilidad en los perfiles de los individuos pertenecientes a cada grupo estudiado (los 3 colonias de referencia y las pecoreadoras recolectadas en el campo), se calcularon las distancias euclídeas (estandarización: z scores, rango 0 a 1) para cada conjunto de muestras. Debido a la falta de homocedasticidad, se comparó la variabilidad entre los grupos utilizando el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Por otro lado, con los mismos componentes principales se realizó un análisis de *cluster* jerárquico que permite agrupar los casos por sus diferencias (“distancias”) o similitudes. Para esto, se utilizó el método de agrupamiento de Ward que utiliza las distancias euclídeas como criterio de divergencia, y que maximiza la homogeneidad dentro de los grupos formados. Al utilizar los componentes principales (que no están correlacionados) en lugar de las variables originales para realizar el análisis de *cluster*, se evitó el problema de una posible correlación de variables que pudo afectar el análisis de *cluster*. Se realizó el análisis de *cluster* con las muestras de las colonias de referencia por un lado y con las muestras de las pecoreadoras recolectadas en el campo por otro. Los análisis de *cluster* jerárquicos son métodos exploratorios de los datos; lo que se busca es poder identificar una solución de agrupamientos que brinde información relevante. La validez de los grupos formado es juzgada mediante una interpretación

cualitativa y por tanto puede ser subjetiva. No obstante, se realizaron análisis discriminantes entre los grupos identificados para validar su agrupación.

4.6. RESULTADOS

4.6.1. Perfil de hidrocarburos cuticulares de *B. atratus*

Se detectaron un total de 102 compuestos. Cincuenta hidrocarburos y 14 compuestos oxigenados (ésteres, ácidos grasos, aldehídos) pudieron ser identificados, mientras 38 compuestos quedaron sin identificar (NI). Los hidrocarburos presentaron cadenas de entre 21 y 33 carbonos. Las clases de HC encontradas incluyeron alcanos y alquenos lineales, alcadienos, alquenos ramificados y metil-alcanos. En todos los alquenos se observó variedad de isómeros aunque no se determinó la posición de sus dobles enlaces (Tabla 5, Figura 15).

Tabla 5 – Compuestos encontrados en los extractos cuticulares de obreras de *B. atratus* en su orden de elución (X e Y refieren a posiciones indeterminadas para las insaturaciones).

Pico	Compuesto	Grupo químico	Pico	Compuesto	Grupo químico
1	Alqueno-ramificado NI	Alqueno ramificado	52	X-Heptacoseno	Alqueno
2	NI		53	Z-Heptacoseno	Alqueno
3	Tetradecanoato de etilo	Éster de ácido graso	54	X-Heptacoseno	Alqueno
4	NI		55	n-Heptacosano	Alcano
5	Hexadecanoato de metilo	Éster de ácido graso	56	NI	
6	Ácido Hexadecanoico	Ácido graso	57	NI	
7	(X)-Hexadecenoato de etilo	Éster de ácido graso	58	NI	
8	Hexadecanoato de etilo	Éster de ácido graso	59	NI	
9	Octadecanal	Aldehído	60	X-octacoseno	Alqueno
10	X-Heneicoseno	Alqueno	61	NI	
11	n-Heneicosano	Alcano	62	NI	
12	Oleato + Linolenato de metilo	Éster de ácido graso	63	Octacosano + Etil-tetracosano	Alcano + alcano ramificado
13	Octadecanoato de metilo	Éster de ácido graso	64	Octacosano	Alcano
14	Ácido Oleico	Ácido graso	65	NI	
15	Linoleato de etilo	Éster de ácido graso	66	X,Y-Nonacosadieno	Alcadieno
16	Oleato de etilo + Linolenato de etilo	Éster de ácido graso	67	X,Y-Nonacosadieno	Alcadieno
17	Octadecanoato de etilo	Éster de ácido graso	68	X,Y-Nonacosadieno	Alcadieno
18	Docosano	Alcano	69	X-Nonacoseno	Alqueno
19	Eicosanal	Aldehído	70	X-Nonacoseno	Alqueno

20	X,Y-Tricosadieno	Alcadieno	71	X-Nonacoseno	Alqueno
21	X-Tricoseno	Alqueno	72	n-Nonacosano	Alcano
22	X-Tricoseno	Alqueno	73	NI	
23	X-Tricoseno	Alqueno	74	NI	
24	X-Tricosano	Alcano	75	NI	
25	NI		76	X-Triaconteno	Alqueno
26	X-Tetracoseno	Alqueno	77	NI	
27	Metil-tricosano + Tetracoseno	Alcano ramificado + alqueno	78	Triacontano + Etil- hexacosano	Alcano + alcano ramificado
28	X-Tetracoseno	Alqueno	79	Triacontano	Alcano
29	X-Tetracoseno	Alqueno	80	NI	
30	Tetracosano	Alcano	81	NI	
31	Docosanal	Aldehido	82	NI	
32	X,Y-Pentacosadieno	Alcadieno	83	NI	
33	X,Y-Pentacosadieno	Alcadieno	84	X-Hentriaconteno	Alqueno
34	X-Pentacoseno	Alqueno	85	X-Hentriaconteno	Alqueno
35	X-Pentacoseno	Alqueno	86	Hentriacontano	Alcano
36	X-Pentacoseno	Alqueno	87	NI	
37	n-Pentacosano	Alcano	88	NI	
38	NI		89	NI	
39	NI		90	NI	
40	NI		91	NI	
41	NI		92	NI	
42	X-hexacoseno	Alqueno	93	X-Tritriaconteno	Alqueno
43	X-Hexacoseno	Alqueno	94	Tritriacontano	Alcano
44	NI		95	NI	
45	NI		96	NI	
46	Etil-docosano + Hexacosano	Alcano ramificado + alcano	97	NI	
47	Hexacosano	Alcano	98	NI	
48	X,Y-Heptacosadieno	Alcadieno	99	NI	
49	X,Y-Heptacosadieno	Alcadieno	100	NI	
50	X,Y-Heptacosadieno	Alcadieno	101	NI	
51	X-Heptacoseno	Alqueno	102	NI	

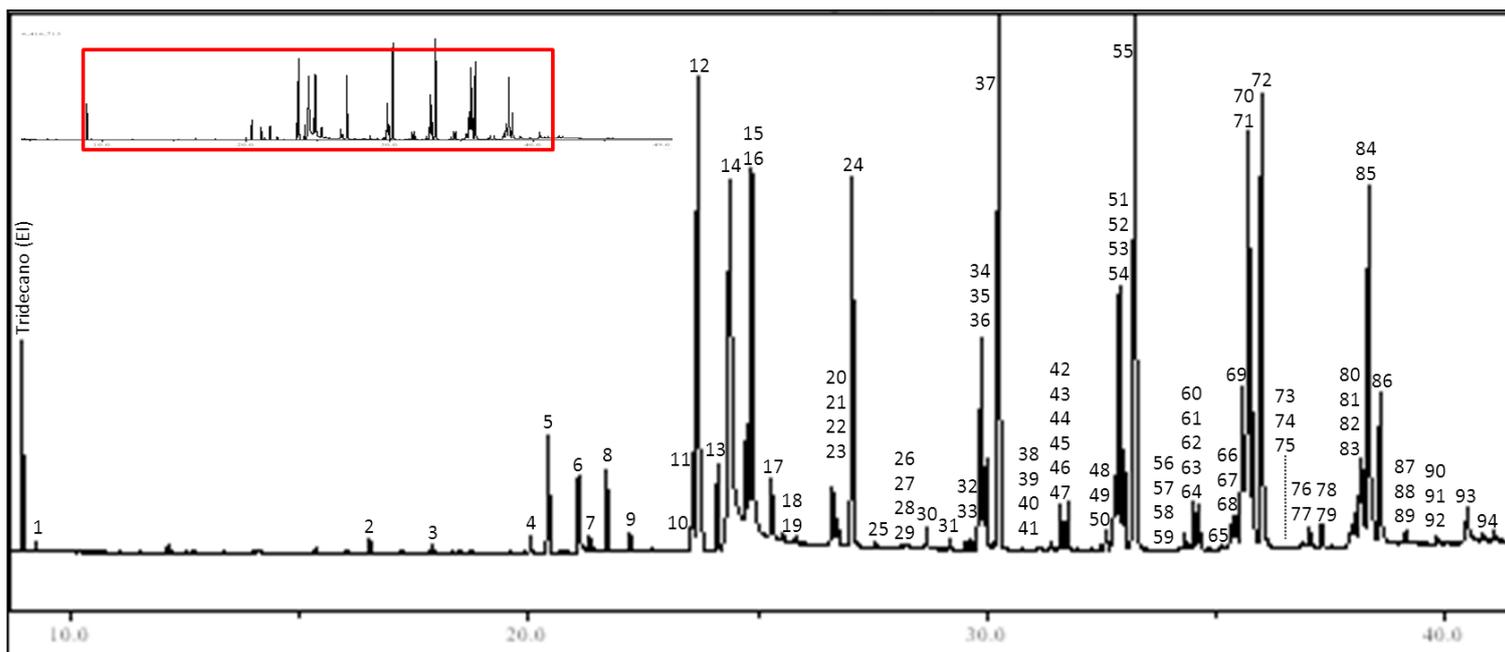


Figura 15 – Cromatograma de de iones totales (TIC) típico del extracto de la cutícula de una obrera de *B. atratus* señalando los picos identificados. Los números se corresponden con los de la Tabla 5. Izquierda arriba: cromatograma completo indicando el fragmento que muestra la figura.

4.6.2. Discriminación de colonias

Del ACP realizado a partir de las cantidades totales de cada pico, se computaron 16 CP (criterio: *scree plot*) que explicaron el 84,35% del total de la varianza. Los perfiles de hidrocarburos de las tres colonias analizadas fueron separados por el AD realizado a partir de esos 16 CP. Se obtuvieron dos funciones discriminantes que influyeron significativamente en la separación de los grupos (función 1: 96,4% de la varianza, λ de Wilks=0,002, $\chi^2=159,062$, $gl=12$, $P < 0,001$; función 2: 3,6% de la varianza, λ de Wilks=0,204, $\chi^2=40,506$, $gl=5$, $P < 0,001$) (Figura 16a). De los casos (individuos) agrupados originalmente, el 100% fueron clasificados correctamente. Los perfiles de las colonias fueron separados principalmente por un total de 477 picos ($loadings > |0,05|$) de los cuales 330 difirieron significativamente entre los colonias (resultados del test Kruskal-Wallis en Anexo). Esos picos correspondieron a iones de 25 compuestos, en su mayoría alcanos y alquenos (en este último caso no se distinguió entre isómeros) (Tabla 6).

Al utilizar las cantidades relativas de cada pico para el ACP, se

obtuvieron 16 PC (criterio: *scree plot*) que explicaron el 84,77% del total de la varianza. El AD realizado a partir de esos PC también separó correctamente los perfiles de hidrocarburos de las tres colonias analizadas. El AD computó dos funciones discriminantes que influyeron significativamente en la separación de las colonias (función 1: 97,6% de la varianza, λ de Wilks=0,001, $\chi^2=174,152$, $gl=16$, $P < 0,001$; función 2: 2,4% de la varianza, λ de Wilks=0,167, $\chi^2=43,899$, $gl=7$, $P < 0,001$) (Figura 16b). El 100% de los casos agrupados originalmente, fueron clasificados de forma correcta. Los perfiles de las colonias fueron separados principalmente por un total de 545 (loadings > |0,05|) picos de los cuales 377 presentaron diferencias significativas entre las colonias (resultados del test Kruskal-Wallis en Anexo). Estos picos correspondieron a iones de los mismos compuestos identificados en el análisis anterior con la excepción de dos de ellos (Tabla 6).

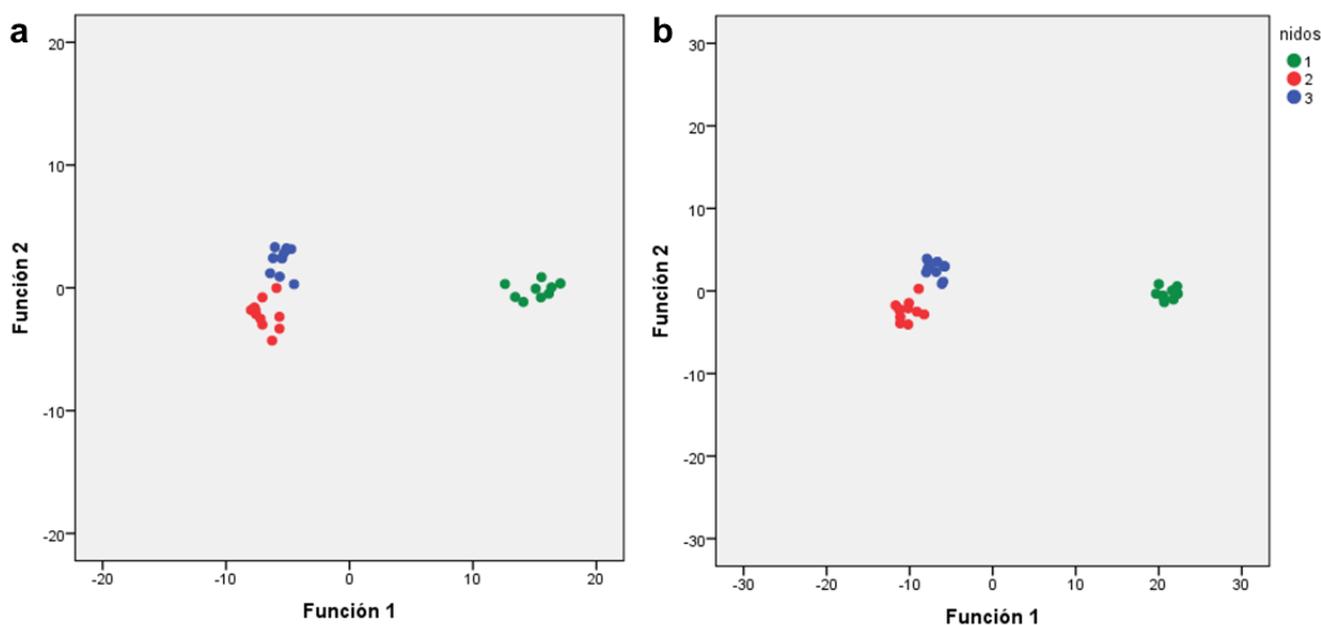


Figura 16 – Análisis discriminante del perfil de hidrocarburos de *B. atratus* provenientes de colonias diferentes (1: colonia A N=9, 2: colonia B N=11, 3: colonia C N=11) utilizando componentes principales de las cantidades totales de los compuestos (a) y de las cantidades relativas de los compuestos (b).

Tabla 6- Compuestos que influyeron de manera importante en la discriminación de colonias y difirieron significativamente entre grupos. Los números indican la cantidad de picos para cada compuesto. No se distinguió entre isómeros de alquenos. En negrita se señalan aquellos compuestos representados por un mayor número de picos significativos.

Nº C	Compuesto	Significativos en AD con cantidades totales de compuestos	Significativos en AD con cantidades relativas de compuestos
23	Tricoseno	1	1
23	n-Tricosano	44	61
24	n-Tetracosano	6	8
25	X,Y-Pentacosadieno	1	4
25	Pentacoseno	27	29
25	n-Pentacosano	60	60
26	Hexacoseno	1	
	Etil-docosano + Hexacosano	2	1
26	n-Hexacosano	5	8
26	X,Y Heptacosadieno	2	4
27	Heptacoseno	26	24
27	n-Heptacosano	49	53
28	Octacoseno	1	
	NI	1	2
28	n-Octacosano	7	8
29	X,Y-Nonacosadieno	2	2
29	Nonacoseno	12	17
29	n-Nonacosano	43	54
	NI	4	4
30	triaconteno	1	1
30	n-Triacontano	4	6
	NI	9	4
31	Hentriaconteno	16	21
31	n-Hentriacontano	1	2
	NI	1	3

Los análisis realizados a partir de las cantidades totales y relativas de compuestos arrojaron resultados similares en cuanto a la correcta discriminación de las colonias y a los compuestos que son significativos para esa separación entre colonias. Teniendo esto en cuenta, los análisis posteriores se realizaron sólo con las cantidades relativas de los picos.

4.6.3. Análisis de los extractos cuticulares de obreras recolectadas en el campo

El ACP realizado con las muestras de referencia (colonias A, B y C) y las muestras de obreras recolectadas a campo con las cantidades relativas de los 377 picos significativos, computó 31 PC (criterio: *scree plot*) que explicaron el 84,13% de la varianza. Estos componentes principales se utilizaron en los análisis siguientes.

La comparación de las distancias euclídeas calculadas a partir de las cantidades relativas de los picos, mostró diferencias significativas en la variabilidad de los perfiles de los distintos grupos analizados (N total=1322; test de Kruskal Wallis=31,491; gl=3; $P < 0,001$) (Figura 16). Al comparar por parejas de grupos, las diferencias entre las distancias son significativas entre las muestras de la colonia B y las de campo (estadístico de prueba=268,243; $P < 0,001$), y entre las de la colonia B y las de la colonia A (estadístico de prueba=-363,711; $P < 0,001$). Las distancias entre perfiles son mayores en la colonia B en ambos casos. Por otro lado, las muestras de campo contienen mayor cantidad de valores atípicos (por encima debajo del cuartil 25% y encima del cuartil 75%) (Figura 17).

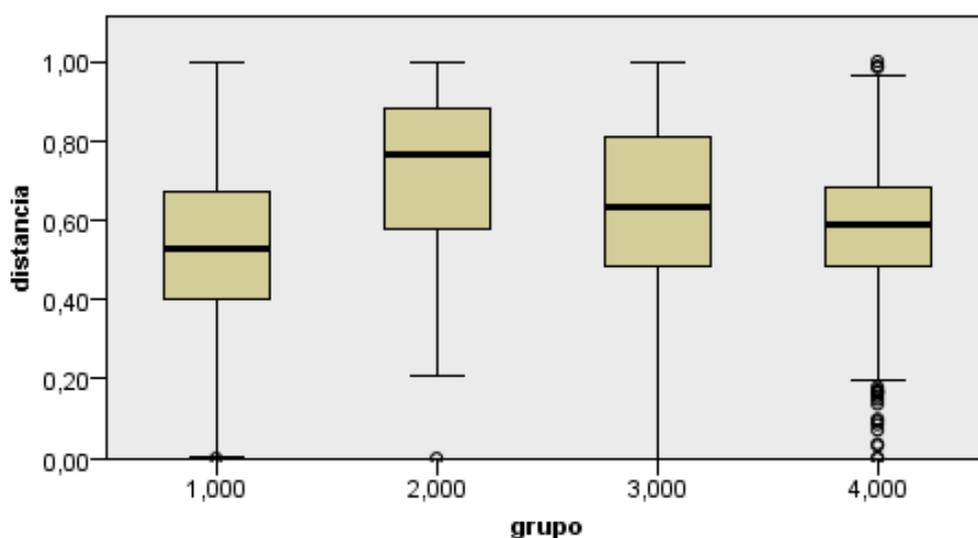


Figura 17 - Distancias euclídeas de los perfiles de cada grupo calculadas a partir de cantidades relativas de 377 picos significativos para la discriminación de colonias. 1: Colonia A; 2: Colonia B; 3: Colonia C; 4: muestras de obreras recolectadas en el campo. El diagrama de caja muestra las medianas, máximos, mínimos, cuartiles 25% y 75% y valores atípicos para cada grupo.

Los dendrogramas obtenidos por el método de agrupamiento de Ward se compararon con los construidos a partir de otros métodos disponibles en el paquete estadístico utilizado (*paired group, single linkage*). El patrón general de los agrupamientos se mantuvo similar, lo que indicaría que existe cierta estructura en los datos que subyace a la clasificación obtenida.

El análisis de *cluster* a partir de los perfiles de las colonias de referencia se llevó a cabo para conocer de qué manera este método de clasificación agrupa individuos pertenecientes a colonias conocidas que previamente habían sido correctamente discriminadas. En el dendrograma obtenido, se observan claramente tres agrupamientos diferenciados entre sí por una distancia bastante mayor que la que separa a los grupos menores que los componen (las ramas son más largas) (Figura 18). Uno de los grupos contiene a todas las muestras de la colonia A y es más cercano a un segundo grupo formado por algunos individuos de la colonia B. El tercer grupo, formado por todos los individuos de la colonia C y el resto de los de la colonia B, aparece más distanciado (Figura 18a). Los perfiles de los individuos de la colonia B en los que no se encontraron esporas de *N. ceranae* (rosado), no parecen agruparse más cercanos entre sí que con el resto de compañeros de colonia.

En el dendrograma obtenido con las muestras de pecoreadoras de campo, tomando como referencia la distancia que separa los tres grupos identificados en el dendrograma de las colonias de referencia (línea naranja en Figura 18), se pueden distinguir cinco agrupamientos igual de homogéneos (similares distancias) a los observados en dicho dendrograma (Figura 18b). Dos de las tres muestras negativas para *N. ceranae* (celeste) poseen perfiles similares mientras que la otra está incluida en un grupo diferente.

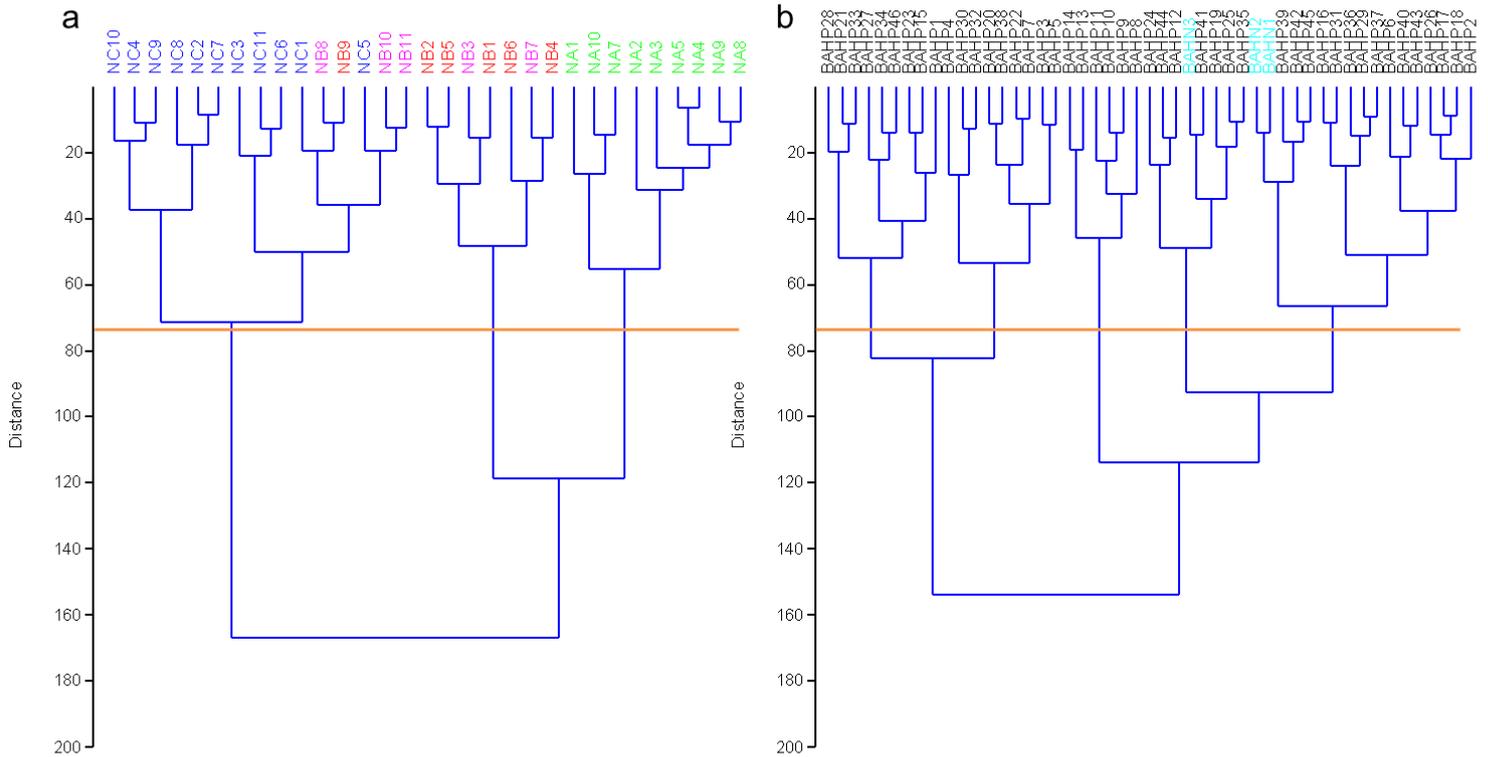


Figura 18 – Dendrograma obtenido utilizando el método de agrupación de Ward a partir de 31 componentes principales de las cantidades relativas de 377 picos identificados como significativos para discriminar entre las colonias. a) Muestras de referencia: verde colonia A; rojo colonia B positivas para *N. ceranae* y rosado sin esporas de *N. ceranae*; azul colonia C. b) Muestras de pecoreadoras recolectadas en el campo; en celeste se señalan las muestras negativas para *Nosema caranae*. La línea naranja corresponde a la distancia que separa grupos en dendrograma (a) por una mayor distancia que la de los grupos menores que los componen.

Para cada dendrograma se realizó un AD para corroborar que los grupos formados pueden ser discriminados correctamente. Para el caso de los tres grupos formados a partir de las colonias de referencia, se obtuvieron dos funciones discriminantes que influyeron en la separación de los grupos (función 1: 96,1% de la varianza, λ de Wilks=0,002, $\chi^2=169,545$, $gl=6$, $P < 0,001$; función 2: 3,9% de la varianza, λ de Wilks=0,193, $\chi^2=44,420$, $gl=2$, $P < 0,001$) (Figura 19a). El 100% de los casos fue clasificado correctamente en los grupos formados en el análisis de cluster. Para los cinco grupos formados en el dendrograma obtenido con las muestras de pecoreadoras de campo, se computaron cuatro funciones discriminantes significativas (función 1: 48,4% de la varianza, λ de Wilks=0,002, $\chi^2=262,904$, $gl=32$, $P < 0,001$; función 2: 28,6%

de la varianza, λ de Wilks=0,017, $\chi^2=168,198$, $gl=21$, $P < 0,001$; función 3: 14,5% de la varianza, λ de Wilks=0,108, $\chi^2=92,455$, $gl=12$, $P < 0,001$; función 4: 8,5% de la varianza, λ de Wilks=0,392, $\chi^2=38,826$, $gl=5$, $P < 0,001$) (Figura 19b, se muestran las funciones 1 y 2). El 98% de los casos fue clasificado correctamente en el grupo correspondiente.

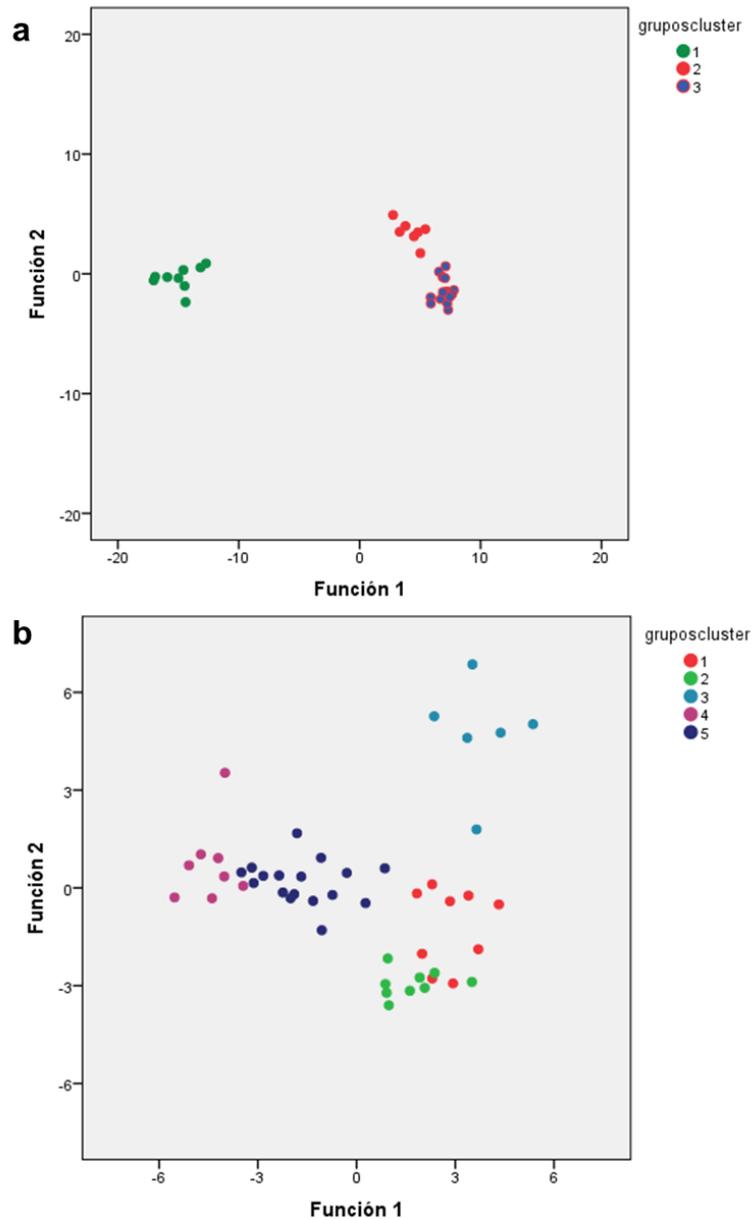


Figura 19 – Análisis discriminante de los grupos formados en el análisis de cluster a partir de 31 componentes principales de las cantidades relativas de 377 picos de los perfiles de HCC de a) las colonias de referencia y b) la muestra de pecoreadoras recolectadas en el campo.

4.7. DISCUSIÓN

En este estudio se obtuvo por primera vez el perfil de compuestos cuticulares de *B. atratus*. Las clases de compuestos identificados se corresponden con las encontradas en otras especies de abejorros (Martin *et al.* 2010, Jarau *et al.* 2012, Blacher *et al.* 2013). Adicionalmente, se observó una alta variedad de isómeros de alquenos, característica presente en otras especies de abejorros, y cuyo perfil ha sido identificado como una importante señal de reconocimiento especie-específica (Martin *et al.* 2010). Haberlo encontrado en una especie lejanamente emparentada a las otras estudiadas sugeriría que se trata de una señal muy conservada dentro del género *Bombus*. El análisis del perfil de HCC de *B. bellicosus* podría ser necesario para confirmar diferencias entre especies simpátricas. Son necesarios análisis más exhaustivos y específicos para completar la identificación de compuestos así como para determinar, por ejemplo, las posiciones de los dobles enlaces en los isómeros de los alquenos.

Al igual que ha sido encontrado en otras especies de abejorros, en *B. atratus* es posible discriminar colonias a partir del perfil de HCC (Ayasse *et al.* 1999, Blacher *et al.* 2013, Rottler *et al.* 2013). Esto confirma la hipótesis planteada de que el perfil de los extractos cuticulares de *B. atratus* varía entre individuos pertenecientes a colonias diferentes. El análisis discriminante clasificó correctamente las colonias al analizar tanto las cantidades totales como las cantidades relativas de los picos. Muchos de los compuestos del perfil de HCC fueron afectados por la identidad de la colonia. No obstante, algunos de ellos parecerían ser más afectados, o sea que aportarían más a la señal discriminante entre miembros de colonias diferentes. En el presente estudio se trabajó con las cantidades correspondientes a todos los iones en los que se fragmenta cada compuesto durante el análisis por GCMS, en lugar de utilizar las cantidades de cada compuesto en conjunto (área del pico en un cromatograma). Los picos identificados como significativos en la discriminación de colonias corresponden a algunos de los iones de cada uno de los diferentes compuestos. La cantidad de iones (picos) que resultó significativa fue diferente para distintos hidrocarburos. En general, fue mayor para los alcanos que para

el resto de los compuestos incluyendo los alquenos, a excepción de los hidrocarburos de 31 carbonos en los que la cantidad de iones fue mayor para el hentriaconteno que para el hentriacontano. Esto podría indicar que el perfil de los alcanos es más importante a la hora de distinguir miembros de colonias diferentes. Los perfiles de los alcanos pueden variar ampliamente entre individuos, ya que la producción de estos compuestos está influida por factores como la temperatura, la humedad o la tarea realizada por la abeja (Martin *et al.* 2010). Por otro lado, sería esperable que los alquenos no varíen demasiado entre individuos, y por tanto tampoco entre colonias, ya que el perfil de isómeros sería especie-específico. La variación en la cantidad de iones con un peso importante también parecería variar en relación al largo de la cadena de los hidrocarburos que componen. Hidrocarburos de largos de cadena específicos han sido asociados a la discriminación de perfiles de colonias diferentes (Ayasse *et al.* 1999, Rottler *et al.* 2013). En este caso, los hidrocarburos de longitud de cadena de 23, 25, 27, 29 y 31 carbonos, fueron los más representados en el conjunto de picos que discriminó las colonias. En el último caso, como se mencionó anteriormente, fue el alqueno el más representado (en lugar del alcano como en los demás). Esto coincidió con resultados de Ayasse *et al.* (1999) quienes encuentran una mayor contribución de los alquenos de cadenas entre 30-33 carbonos a la función discriminante entre colonias de *B. terrestris*. Son necesarios otros análisis y más específicos para corroborar que estos aspectos influyen en la discriminación de colonias en *B. atratus*.

La hipótesis planteada en cuanto a que los perfiles de hidrocarburos cuticulares permitirían determinar el número de colonias representadas en una muestra de pecoreadoras recolectadas en el campo, no fue confirmada. Los datos utilizados no permitieron mediante el análisis de *cluster* agrupar por separado a todos los individuos pertenecientes a cada una de las colonias de referencia, especialmente los de la colonia B. Algunos de los individuos se agruparon en un grupo homogéneo más cercano al grupo formado por la colonia A, mientras que otros individuos fueron incluidos en un grupo junto con las muestras de la colonia C. La falta de una buena separación entre los individuos de las colonias B y C, podría estar relacionada al hecho de que ambas colonias fueron obtenidas mediante cría artificial de abejorros en

laboratorio. Las condiciones en las que los nidos son mantenidos en el laboratorio son mucho más homogéneas que las condiciones naturales. El material del nido (cajas de madera), la temperatura, la humedad y la alimentación (jarabe y mezcla de polen de abejas melíferas) son iguales para todas las colonias. Este último factor es particularmente importante, ya que puede influir considerablemente en el perfil de hidrocarburos cuticulares producido (Liang & Silverman 2000, Blomquist & Bagnères 2010). De hecho, ha sido encontrado para otros insectos que en los especímenes de laboratorio los HCC no son exactamente los mismos que en especímenes de campo (Blomquist & Bagnères 2010). Además, las obreras de esas colonias nunca salieron del nido y por tanto no realizaron actividades de forrajeo. Esto, además de tener efectos sobre la dieta, evitó la posible influencia de otros factores ambientales que también podrían afectar la producción de hidrocarburos como la incorporación de compuestos de resinas reportado para otros insectos sociales (Leenhardt *et al.* 2011) o el contacto con co-específicos o congéneres que podrían influir en la expresión de las señales de reconocimiento (Blomquist & Bagnères 2010). Una observación que refuerza la sugerencia de que los perfiles de las colonias B y C estaban afectados por otros factores es que la variación de las distancias entre los perfiles de los individuos de estas colonias, especialmente de la B, es mayor que la colonia A (Figura 17). Como dato interesante, la colonia B incluye individuos en los que no se encontraron esporas de *N. ceranae* mientras que el resto de los individuos poseían esporas del microsporidio. En abejas melíferas se ha encontrado que la infección con *N. ceranae* modifica el perfil general de HCC (McDonnell *et al.* 2013), aunque resultados obtenidos por otras investigaciones no se han encontrado estas diferencias (C. Rossini com. pers.). En el presente estudio, los perfiles de individuos que no presentaron esporas no parecerían agruparse más cercanos entre sí que con el resto de los compañeros de colonia. No obstante, es un factor que podría estar afectando la variabilidad en los perfiles y por tanto las diferencias/similitudes con compañeros de colonias y co-específicos de colonias diferentes. En las muestras provenientes de pecoreadoras de campo, el número de individuos negativos para *N. ceranae* es muy bajo (N=3) como para poder observar un patrón que aporte a la discusión de este tema. Se

requieren análisis adicionales de los perfiles de los individuos no infectados, así como de un mayor número de los mismos para dilucidar estos aspectos.

A pesar de las limitantes mencionadas, los resultados sugerirían que hay más de una colonia presente en la muestra de pecoreadoras de *B. atratus* recolectadas en el campo. En el análisis de *cluster* se pudo constatar que los individuos pueden ser separados en grupos, y que esos grupos pueden ser discriminados por el perfil de hidrocarburos. Varios de esos grupos son iguales o más homogéneos que los formados por individuos de una colonia de referencia. Por otro lado, algunos agrupamientos podrían contener individuos de más de una colonia, ya que las distancias que separan a los individuos que los componen son similares a las del grupo formado por la colonia C y algunos individuos de la colonia B. Esto, aunque es una de las limitantes para poder determinar el número de colonias en la muestra, apoyaría la sugerencia de que las pecoreadoras recolectadas en el campo pertenecen a más de una colonia.

En relación a la presencia de *N. ceranae*, si se consideran los cinco agrupamientos identificados en el análisis de cluster como posibles colonias diferentes, la prevalencia de *N. ceranae* en la población local de *B. atratus* analizada sería del 100% ya que todas las colonias contienen individuos infectados.

La identificación del perfil de HCC de *B. atratus* y la constatación de que se pueden discriminar colonias a partir de los mismos, es un importante aporte para diversos estudios. Los HCC, además de estar marcadamente influidos por factores genéticos, especialmente aquellos que son señales comunicativas esenciales, pueden ser afectados por diversos factores ambientales como la dieta, la temperatura, la humedad, la agrupación de colonias coespecíficas o la presencia de parásitos (Liang & Silverman 2000, Blomquist & Bagnères 2010, Leonhardt *et al.* 2013, McDonnell *et al.* 2013, Martin *et al.* 2013). Contar con la herramienta desarrollada será útil para estudiar los efectos y la importancia relativa de estas variables ambientales sobre los hidrocarburos cuticulares y cómo eso puede afectar las interacciones entre individuos.

Por otro lado, los resultados señalarían que mejorando la calidad de los datos (usando un mayor número de individuos por colonia de referencia y

colonias de referencia en similares condiciones que las muestras a estudiar) y explorando otras técnicas de análisis multivariado, se podría realizar un mejor y más exhaustivo análisis buscando determinar las características de los perfiles de HCC que permitan la distinción clara de colonias a partir de muestras de campo. El uso en conjunto del análisis de perfiles de hidrocarburos cuticulares con técnicas moleculares con microsatélites para determinar el parentesco de los abejorros recolectados en el campo (Darvill *et al.* 2004), podrían ayudar a ajustar y a corroborar la utilidad del método.

5. CONSIDERACIONES FINALES

Este es el primer estudio que presenta datos sobre la prevalencia y nivel de infección de *N. ceranae* en abejorros (*Bombus* sp). Las razones expuestas como posibles explicaciones de la variación en esos parámetros refuerzan la necesidad de estudios más a largo plazo para conocer la dinámica de las interacciones parásito-hospedero. La posibilidad de que factores ambientales tales como la disminución en la disponibilidad de alimento afecten de manera importante la prevalencia de *N. ceranae* es preocupante teniendo en cuenta los cambios en la intensidad de uso del suelo que vienen ocurriendo en nuestro país en los últimos 20 años. La disminución en la disponibilidad de recursos alimenticios no sólo puede afectar la nutrición de los abejorros, sino que también podría aumentar el contacto entre los polinizadores en los restringidos recursos florales disponibles. De esta manera, podría afectar también la transmisión de parásitos y patógenos entre diferentes hospederos. Teniendo en cuenta que las abejas melíferas y los abejorros comparten los recursos florales con otros polinizadores y la capacidad de *N. ceranae* de infectar varias especies, es posible que este parásito pueda expandirse y “saltar” hacia nuevas especies hospederas. La presencia de un patógeno tan amenazante como lo es *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.* 2007, Higes *et al.* 2013) podría ser perjudicial no sólo para las poblaciones de abejorros sino también para el resto de la comunidad nativa de polinizadores y para la industria apícola. Los efectos serán especialmente alarmante para especies más vulnerables como *B. bellicosus*, que posee una distribución más acotada en América del Sur (Abrahamovich & Díaz 2002) que además ha ido disminuyendo en los últimos 30 años (Martins & Melo 2009, Martins *et al.* 2015). Los autores plantean que esa disminución estaría asociada a la pérdida de hábitat por causas antropogénicas, a la contaminación y al cambio climático. La pérdida de hábitat, el cambio climático y los parásitos y patógenos pueden actuar sinérgicamente causando pérdidas de polinizadores alrededor del mundo. La proyección de contracción futura en la distribución de *B. bellicosus* planteada por Martins *et al.* (2015) debido al cambio climático, sumado a los potenciales efectos perjudiciales de *N. ceranae* podrían tener consecuencias catastróficas para esta especie. Aunque en las investigaciones mencionadas no se analiza ni

plantea la presencia de parásitos y patógenos, resulta interesante que el comienzo planteado para la disminución de *B. bellicosus* coincida aproximadamente en el tiempo con la presencia de *N. ceranae* en el continente sudamericano (Teixeira *et al.* 2013). Esto plantea la urgencia de realizar estudios sobre los efectos de *N. ceranae* sobre *B. bellicosus* a nivel individual, colonial y poblacional, así como en otras especies hospederas. Al mismo tiempo, es necesario continuar con estudios sobre la presencia y la prevalencia del patógeno en diferentes poblaciones de las especies de abejorros y de otras abejas (Apoidea). Esta información será insumo importante para el desarrollo de políticas de protección de especies ecológica y económicamente importantes como son los polinizadores.

Nosema ceranae parecería ser un parásito muy versátil encontrándose en un gran número de hospederos incluyendo varias especies de abejas melíferas (*Apis* spp.), de abejorros (*Bombus* spp.) y de abejas solitarias. Esta multiplicidad de hospederos podría afectar la evolución del parásito. Tener varias especies hospederas afecta el potencial de los patógenos para co-evolucionar con un hospedero. La adaptación a una población de hospederos puede limitar la capacidad de infectar otras poblaciones y además, tener varios hospederos puede traducirse en una menor presión de selección sobre el patógeno para co-evolucionar con cualquiera de ellos (Woolhouse *et al.* 2002). La virulencia y la epidemiología de un parásito en un sistema parásito-multi hospedero, dependerán de sus interacciones con todas las diferentes especies hospederas (Rutrecht & Brown 2009). Se ha propuesto que las diferencias en el valor de las distintas especies hospederas para el *fitness* del parásito (diferencias en la “calidad del hospedero” desde el punto de vista del parásito) podrían estar determinando la evolución de la virulencia (Rigaud *et al.* 2010). Adicionalmente, las tasas de transmisión del parásito dentro y entre las especies hospederas también jugarían un rol importante (Rigaud *et al.* 2010). Cuando la transmisión del patógeno es menor entre especies que dentro de una misma especie, el sistema se caracterizaría por dinámicas estables que facilitan la persistencia del patógeno. Por otro lado, cuando la transmisión entre especies aumenta, aquellas especies que sean más capaces de recuperarse de una epidemia podrían llevar a las demás a la extinción (Dobson 2004). Poco

se conoce acerca de los efectos y la forma de transmisión de *N. ceranae* en la mayoría de sus hospederos. La transmisión entre especies estaría facilitada por el uso compartido de recursos florales. Los efectos se conocen para *A. mellifera*, en la cual se han reportado diferencias en la virulencia entre regiones geográficas que podrían estar asociadas a diferencias en el grado de heterocigosis entre las poblaciones de *N. ceranae* (Sagastume *et al.* 2015). Por otro lado, en *B. terrestris* los efectos encontrados sugerirían una mayor virulencia en los abejorros que en las abejas melíferas (Graystock *et al.* 2013). No obstante, la alta prevalencia y nivel de infección que parecerían soportar las poblaciones de *B. atratus* y *B. bellicosus* en Uruguay, podría indicar diferencias en la virulencia entre diferentes especies de abejorro. Son necesarias investigaciones que incluyan las interacciones entre *N. ceranae* y sus diferentes especies hospederas. Los abejorros han sido utilizados en diferentes oportunidades como modelo para el estudio de interacciones parásito hospedero. Poseer colonias caracterizadas por un ciclo anual cuyas reinas generalmente se aparean con un único macho, los convierte en un sistema ideal para estudiar la transmisión de parásitos y patógenos dentro y entre colonias, así como la adaptación de sus parásitos a especies hospederas y ambientes específicos (Schmid-Hempel 2001, Eler *et al.* 2012). La presencia en Uruguay de dos especies simpátridas que utilizan numerosos recursos vegetales en común y que, a su vez comparten en gran parte con *A. mellifera*, resulta en un sistema parásito-multihospederos interesante y relativamente sencillo para estudiar los diversos asuntos planteados. Esto aportaría al conocimiento de un patógeno que podría estar amenazando a las comunidades de polinizadores mundialmente y al entendimiento de complejos sistemas multihospederos.

6. CONCLUSIONES

1. *Nosema ceranae* es un patógeno prevalente en los abejorros nativos *Bombus atratus* y *B. bellicosus* encontrándose distribuido en diferentes zonas del país.
2. Las diferencias encontradas entre especies en la prevalencia sugieren posibles diferencias en la susceptibilidad al patógeno.
3. Las diferencias encontradas en el nivel de infección entre los sexos pueden deberse a diferencias en la transmisión del microsporidio asociadas a características de la historia de vida de los abejorros en combinación con la dinámica temporal de la infección.
4. La misma población de *N. ceranae* estaría circulando en abejorros y abejas melíferas en Uruguay.
5. El perfil de HCC de *B. atratus* permite discriminar entre individuos pertenecientes a colonias diferentes. Sin embargo, el análisis de perfiles de individuos recolectados en el campo no permite agruparlos con certeza por origen colonial, aunque sí confirmar que provienen de más de una colonia.
6. El estudio de *N. ceranae* a partir una muestra de pecoreadoras recolectadas en el campo sería indicador de la situación a nivel poblacional ya que en la misma estarían representadas varias colonias de la población local de abejorros.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamovich, A.H.; Díaz, N.B. 2002. Bumble bees of the Neotropical region (Hymenoptera: Apidae). *Biota Colombiana*, 3: 199-214

Abrahamovich, A.H.; Díaz, N.B.; Lucía, M. 2005. Las especies del género *Bombus* Latreille en Argentina (Hymenoptera: Apidae). Estudio taxonómico y claves para su identificación. *Neotropical Entomology*, 34: 235-250

Adams R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.

Alaux C., Ducloz F., Crauser D. and Le Conte Y. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6: 562–565

Anido M., Branchiccela B., Castelli L., Harriet J., Campá J., Zunino P. and Antúnez K. 2015. Prevalence and distribution of honey bee pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*

Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P., and Higes M. 2009. Immune-suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* 11: 2284–2290

Antúnez K., Anido M., Branchiccela M.B., Harriet J., Campá J., Invernizzi C., Martín-Hernández R., Higes M. y Zunino P. 2013. Despoblación de colmenas. Serie FPTA N° 41. INIA, Uruguay. 36 pp.

Antúnez K., Anido M., Branchiccela B., Harriet J., Campa J., Invernizzi C., Santos E., Higes M., Martín-Hernández R. and Zunino P. 2015. Seasonal variation of honey bee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*. 70: 522-533

Arbetman M.P., Meeus I., Morales C.L., Aizen M.A. and Smagghe G. 2012. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive Bumblebee. *Biological Invasions* 15 (3): 489-494

Arbulo N., Antúnez K., Santos E., Salvarrey S., Higes M. & Invernizzi C. 2011. Presence of the microsporidium *Nosema ceranae* in *Bombus atratus* and *B.bellicosus*, two Uruguayan native bumblebee species. En: <http://www.apimondia.com/es/bases-de-datos/actas-de-congressos>. XXXXII Apimondia International Apicultural Congress. Buenos Aires, Argentina.

Ayasse M., Birnbaum J., Tengö J., Doorn A. van, Taghizadeh T. and Francke W. 1999. Caste- and colony-specific chemical signals on eggs of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Chemoecology* 9: 119-126

Baer B. and Schmid-Hempel P. 1999. Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumblebee. *Nature* 397: 151–154.

Blacher P., Boreggio L., Leroy C., Devienne P., Châline N. and Chameron S. 2013. Specific recognition of reproductive parasite workers by nest-entrance guards in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Frontiers in Zoology* 10 (74): 1-11

Blomquist G.J. and Bagnères A-G. (Eds) 2010. *Insects hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology*. Cambridge University Press.

Branchiccela B. 2014. Una aproximación a la epidemiología de *Nosema ceranae* y su rol potencial en la despoblación de colonias de abejas *Apis mellifera*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Biología, Subárea Microbiología. PEDECIBA, Udelar. 106p

Brown, M. J. F. 2011. The trouble with bumble bees. *Nature* 469:169–170

Brown M.J.F., Loosli R. and Schmid-Hempel P. 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* 91: 421–427

Brunner F.S., Schmid-Hempel P. and Barribeau S.M. 2014. Protein-poor diet reduces host-specific immune gene expression in *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society B* 281: 1-10

Cameron S.A. and Williams P.H. 2003. Phylogeny of bumble bees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28(3): 552-563

Cameron S. A., Lozier J.D, Strange J.P., Koch J.B., Cordes N., Solter L.F. and Griswold T.L. 2011. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS* 108: 662 – 667

Capella-Gutiérrez S., Marcet-Houben M. and Gabaldón T. 2012. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biology* 10 (1): 47-60

Chaimanee V., Chen Y., Pettis J.S., Cornman R.S. and Chantawannakul P. 2011. Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and

Asian honeybees in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: 229–233

Chen Y.P., Evans J.D., Murphy C., Gutell R., Zuker, M., Gundensen-Rindal D. and Pettis J.S. 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J Eukaryot Microbiol* 56: 142–147

Colla S.R., Otterstatter M. C., Gegear R. J. and Thomson J. D. 2006. Plight of the bumble bee: pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation* 129: 461-467

Cremer S., Armitage S.A. and Schmid-Hempel P. 2007. Social immunity. *Current biology* 17(16): R693-R702.

Dafni, A., Kevan, P., Gross, C.L. & Goka, K. 2010. *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: An assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. *Applied Entomology and Zoology*, 45: 101- 113

Dani, F.R. 2009. Cuticular lipids as semiochemicals in paper wasps and other social insects. *Annales Zoologici Fennici* 43: 500-514

Daszak P., Cunningham A.A. and Hyatt A.D. 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287: 443-449

Darvill B., Knight M.E. and Goulson D. 2004. Use of genetic markers to quantify bumblebee foraging range and nest density. *Oikos* 107: 471-478

Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., Belzunces L.P., Decourtye A., Kretzschmar A., Suchail S., Brunet J.L. and Alaux C. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE* 8:e72016

Dobson A. 2004. Population dynamics of pathogens with multiple host species. *American Naturalist* 164: S64–S78.

Dussaubat C., Maisonnasse A., Alaux C., Tchamitchan S., Brunet J., Plettner E., Belzunces L., Le Conte Y. 2010. *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*. 36: 522 – 525

Dussaubat C., Sagastume S., Gómez-Moracho T., Botías C., García-Palencia P., Martín-Hernández R., Le Conte Y. and Higes M. 2013. Comparative

study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Veterinary Microbiology* 162: 670–678

Erler S., Popp M., Wolf S., Lattorff H. and Michael G. 2012. Sex, horizontal transmission, and multiple hosts prevent local adaptation of *Crithidia bombi*, a parasite of bumblebees (*Bombus* spp.). *Ecology and Evolution* 2: 930–940.

Forsgren E. and Fries I. 2009. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* 170 (3-4): 212-217

Fries I., De Ruijter A.A.D., Paxton R.J., Da Silva A.J., Slemendia S.B. and Pieniasek N.J. 2001. Molecular characterization of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of Apicultural Research* 40: 91–96

Fries, I. (2010) *Nosema ceranae* in European honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 73-79

Fries I., Chauzat M., Chen Y., Doublet V., Genersch E., Gisder S., Higes M., McMahon D.P., Martín-Hernández R., Natsopoulou M., Paxton R.J., Tanner G., Webster T.C. and Williams G.R. 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1-28

Fries I., Feng F., da Silva A., Slemend, S.B. and Pieniasek N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. Sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* 32: 356–365

Franzen C. 2008. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal* 2: 1-34

Furst M.A., McMahon D.P., Osborne J.L., Paxton R.J., and Brown M.J.F. 2014. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 506: 364-366

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: 810–821

Gamboa V., Ravoet J., Brunain M., Smaghe G., Meeus I., Figueroa J., Riaño D. and de Graaf D.C. 2015. Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. *Journal of Invertebrate Pathology* 129: 36-39

Genersch E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(1): 87-97

Genersch E., Yue C., Fries I., and de Miranda J. R. 2006. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* 91:61–63

Gillespie S. 2010. Factors affecting parasite prevalence among wild bumblebees. *Ecological Entomology* 35: 737–747

Gisder S. Hedtke K. Mockel N., Frielitz M., Linde A., and Genersch E. 2010. Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (9): 3032–3038

Gómez-Moracho T., Maside X., Martín-Hernández R., Higes M., and Bartolomé C. 2013. High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology* 141: 475–481

Goulson D. 2003a. *Bumblebees: their behaviour and ecology*. Oxford University Press, UK

Goulson D. 2003b. Conserving wild bees for crop pollination. *Food, Agriculture & Environment* 1: 142-144

Goulson D. 2003c. Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 1–26

Goulson D. 2010. Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America. *Applied Entomology and Zoology* 45: 7-12

Goulson D. & Hughes O.H. 2015. Mitigating the anthropogenic spread of bee parasites to protect wild pollinators. *Biological Conservation* 191 (2015) 10–19

Goulson D., Nicholls E., Botías C. and Rotheray E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347 (6229): 1255957-1- 1255957-9

Graystock P., Yates K., Darevill B., Goulson D. & Hughes W.O.H. 2013. Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 114–119

Graystock P., Goulson D. and Hughes W.O.H. 2014. The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees. *PeerJ* 2: e522

Graystock P., Goulson D. & Hughes W.O.H. 2015. Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 282: 1-7

Greene M. 2010. Cuticular hydrocarbon cues in the formation and maintenance of insect social groups. En: *Insects hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology*. Eds. Blomquist G.J. and Bagnères A-G. Cambridge University Press. pp 244-253

Harriet J. & Campá J. 2012. Productividad de miel por colmena. *Actualidad Apícola. Revista de la Sociedad Apícola del Uruguay*. 94:12-15

Hatjina F., Tsoktouridis G., Bouga M., Charistos L., Evangelou V., Avtzis D., Meeus I., Brunain M., Smagghe G. and de Graaf D.C. 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology* 108: 131–134

Heinrich, B. 2004 (2^o ed.). *Bumblebee Economics*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA

Higes M., Martín-Hernández R. and Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 93–95

Higes M., García-Palencia P., Martín-Hernández R., Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*. 94: 211-217

Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido Bailón E., González-Porto A.V., Barrios L., del Nozal M.J., Bernal J.L, Jiménez J.J., García Palencia P. and Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10(10):2659-2669

Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., García-Palencia P., Meana A. 2008 Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in

corbicular pollen of forager honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 76–78

Higes, M., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C noseiosis. *Apidologie* 41: 375–392

Higes M., Meana A., Bartolomé C., Botías C. & Martín-Hernández R. 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* 5(1): 17-29

Howard R. W. and Blomquist G. J. 2005. Ecological, behavioural and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review Entomology* 50:371–393

Huang W-F., Jiang J-H., Chen Y-W. and Wang C-H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38 (1): 30-37

Huth-Schwarz A., Settele J., Moritz R.F.A. and Bernhard Kraus F. 2012. Factors influencing *Nosema bombi* infections in natural populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 48–53

Imhoof B. and Schmid-Hempel P. 1999. Colony success of the bumble bee, *Bombus terrestris*, in relation to infections by two protozoan parasites, *Crithidia bombi* and *Nosema bombi*. *Insectes Sociaux* 46: 233-238

Invernizzi C. 2012. Physiological susceptibility and hygienic behavior affect chalkbrood disease incidence in worker and drone larvae in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research* 51(1): 91-99

Invernizzi C., Abud C., Tomasco I., 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: 150 – 153.

Invernizzi C., Antúnez K., Campa J.P., Harriet J., Mendoza Y., Santos E. and Zunino P. 2011. Sanitary situation of the Uruguayan honeybees. *Veterinaria* 42: 9-13

Invernizzi C., Santos E., García E., Daners G., Di Landro R., Saadoun A. and Cabrera C. 2011. Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucaliptus grandis* plantations. *Archivos de Zootecnia* 60:1303–1314

Izaguirre P. and Beyhaut R. 1997. Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1 -Papilionoideae (Faboideae). Montevideo: Hemisferio Sur

Jarau S., Žáček P., Šobotník J., Vrkoslav V., Hadravová R., Coppée A., Vasickova S., Jiros P. and Valterová I. 2012. Leg tendon glands in male bumblebees (*Bombus terrestris*): structure, secretion chemistry, and possible functions. *Naturwissenschaften* 99(12): 1039-1049

Kearns C.A., Inouye D.W. and Waser N.M. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112

Keeling P.J. and Fast N.M. 2002. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Reviews of Microbiology* 56: 93–116

Klee J., Tay W.T. and Paxton R.J. 2006. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 98–104

Klee J., Besana A.M., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., Chinh T.X., Puerta F., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I. and Paxton R.J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 1–10

Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C. and Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceeding of the Royal Society B* 274: 303-313

Knight M. E., Martin A. P., Bishop S., Osborne J. L., Hale R. J., Sanderson R.A. and Goulson D. 2005. An interspecific comparison of foraging range and nest density of four bumblebee (*Bombus*) species. *Molecular Ecology* 14: 1811–1820

Konig C. and Schmid-Hempel P. 1995. Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumblebee, *Bombus terrestris* L. *Proceedings of the Royal Society London B* 260: 225–227

Kremen C., Williams N.M. and Thorp W. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *PNAS* 99: 16812-16816

Larsson J.I.R. 2007. Cytological variation and pathogenicity of the bumble bee parasite *Nosema bombi* (Microspora, Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 1–11

Lazzaro B.P. and Little T.J. 2009. Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions B* 364 (1513): 15–26

Leonhardt S. D., Form S., Blüthgen N., Schmitt T. and Feldhaar H. 2011. Genetic relatedness and chemical profiles in an unusually peaceful eusocial bee. *Journal of Chemical Ecology* 37:1117-1126

Li J., Wu J., Wenjun P., Jiandong A., Zhanbao G. and Yuemin T., 2005. *Nosema bombi*, a microsporidian pathogen of the bumble bee *Bombus lucorum*. *Journal of Apicultural Science* 49 (1): 53-57

Li J., Chen W., Wu J., Peng W., An J., Schmid-Hempel P. and Schmid-Hempel R. 2012. Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China *International Journal for Parasitology* 42 (1): 49-61

Liang D. and Silverman J. 2000. “You are what you eat”: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften* 87(9): 412-416

Linstrom P. and Mallard W. G. 2005. NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland

Logan A., Ruiz-Gonzalez M. X. and Brown M. J. F. 2005. The impact of host starvation on parasite development and population dynamics in an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology* 130:637–642

McDonnell C. M., Alaux C., Parrinello H., Desvignes J. P., Crauser D., Durbesson E., Beslay D. and Le Conte Y. 2013. Ecto-and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC ecology* 13(1): 25

Maggi M., Lucia M. and Abrahamovich A.H. 2011. Study of the acrofauna of native bumblebee species (*Bombus*) from Argentina. *Apidologie* 42: 280-292

Manley R., Boots M. and Wilfert L. 2015. Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *Journal of Applied Ecology* 52: 331–340

Martin S.J. and Drijfhout F.P. 2009. How Reliable is the Analysis of Complex Cuticular Hydrocarbon Profiles by Multivariate Statistical Methods? *Journal Chemical Ecology* 35:375–382

Martin S.J., Carruthers J.M., Williams P.H. and Drijfhout F.P. 2010. Host specific social parasites (*Psithyrus*) indicate chemical recognition system in bumblebees. *Journal of Chemical Ecology* 36(8): 855-863

Martin S. J., Vitikainen E., Shemilt S., Drijfhout F. P. and Sundström L. 2013. Sources of variation in cuticular hydrocarbons in the ant *Formica exsecta*. *Journal of chemical ecology* 39 (11-12): 1415-1423

Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Martínez Salvador A., Garrido-Bailón E. and Higes M. 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20): 6331–6338

Martín-Hernández R., Botías C., Garrido Bailón E., Martínez-Salvador A, Prieto L., Meana A. and Higes M. 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology* 14: 2127–2138

Martins A.C. and Melo G.A.R. 2009. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? *Journal of Insect Conservation* 14: 207–210

Martins A.C., Silva D.P., De Marco P. and Melo. G.A.R. 2015. Species conservation under future climate change: the case of *Bombus bellicosus*, a potentially threatened South American bumblebee species. *Journal of Insect Conservation* 19(1): 33-43

Medici S.K., Sarlo E.G., Porrini M.P., Braunstein M. and Eguaras M.J. 2012. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology Research* 110: 859–864

Meeus I., Brown M.J.F., De Graaf D.C. and Smagghe G. 2011. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. *Conservation Biology* 25: 662–671

Meeus I., de Miranda J.R., de Graaf D.C., Wackers F. and Smagghe G. 2014. Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 64–69

Mendoza Y., Harriet J., Campa J., Katz H., Ramallo G., Díaz-Cetti S., Invernizzi C. 2013. Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia* 17: 108-113

Michener, C.D. 1974. The Social behavior of Bees. A comparative study. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts

Michener, C.D. 2007 (2nd ed.). The bees of the world. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, USA

Morales C.L., Arbetman M.P., Cameron S.A. and Aizen M. A. 2013. Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11: 529–534

Moret Y. and Schmid-Hempel P. 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290(5494):1166-1168

Murray T.E., Coffey M.F., Kehoe E. and Horgan F.G. 2013. Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation* 159: 269–276

Naug D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*: 2369–2372

Neumann P., and Carreck N.L. 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 1-6.

O'Donnell S. and Beshers S. 2004. The role of male disease susceptibility in the evolution of haplodiploid insect societies. *Proceedings of the Royal Society B* 271: 979–983

O'Mahony E.M., Tay W.T. and Paxton R.J. 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 103–109

Oldroyd B.P. 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology and Evolution* 14(8):312-315

Oldroyd B.P. 2007. What's Killing American Honey Bees? *PLoS Biol* 5(6): e168.

Otterstatter M. C. and Thomson J.D. 2008. Does Pathogen Spillover from Commercially Reared Bumble Bees Threaten Wild Pollinators? *PLoS ONE* 3(7): e2771

Otti O. and Schmid-Hempel P. 2007. *Nosema bombi*: A pollinator parasite with detrimental fitness effects. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 118–124

Otti O. and Schmid-Hempel P. 2008. A field experiment on the effect of *Nosema bombi* in colonies of the bumblebee *Bombus terrestris*. *Ecological Entomology* 33: 577–582

Paxton R.J. 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research* 49 (1): 80-84

Paxton R.J., Klee J., Korpela S. and Fries I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38: 558–565

Pie M.R., Rosengaus R.B. and Traniello J.F.A. 2004. Nest architecture, activity pattern, worker density and the dynamics of disease transmission in social insects. *Journal of Theoretical Biology* 22: 45–5

Plischuk S. and Lange C.E. 2009. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) parasitized by a flagellate (Euglenozoa: Kinetoplastea) and a neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida). *Journal of Invertebrate Pathology* 102 (3): 261–263

Plischuk S. & Lange C.E. 2012. *Sphaerularia bombi* (Nematoda: Sphaerulariidae) parasitizing *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) in southern South America. *Parasitology Research* 111: 947–950

Plischuk S., Martín-Hernández R., Prieto L., Lucía M., Botías C., Meana A., Abrahamovich A.H., Lange C. and Higes M. 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* 1(2): 131–135

Plischuk S., Meeus I., Smaghe G. and Lange, C.E. 2011. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Environmental Microbiology Reports* 3 (5): 565–568

Plischuk S., Sanscrainte N.D., Becnel J.J., Estep A.S. and Lange C.E. 2015. *Tubulinosema pampeana* sp. n. (Microsporidia, Tubulinosematidae), a pathogen of the South American bumble bee *Bombus atratus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 126: 31-42

Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A. and Orešič M. 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11: 395

Porrini M.P., Sarlo E.G., Medici S.K., Garrido P.M., Porrini D.P., Damiani N. and Eguaras M.J. 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*:

influence of diet and infective inoculum. *Journal of Apicultural Research* 50: 35–41

Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. and Kunin W.E. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 345–353

Ravoet J., De Smet L., Meeus I., Smaghe G., Wenseleers T. and de Graaf, D.C. 2014. Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 122: 55–58

Reynaldi F., Sguazza G.H., Albicoro F.J., Pecoraro M.R. and Galosi, C.M. 2013. First molecular detection of co-infection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus* in South America. *Brazilian Journal of Biology* 73 (4): 797–800

Rigaud T., Perrot-Minnot M-J. and Brown M.J.F. 2010. Parasite and host assemblages: embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 3693–3702

Rottler A.M., Schulz S., Ayasse M. 2013. Wax lipids signal nest identity in bumblebee colonies. *Journal of Chemical Ecology* 39:67–75

Roudel M., Aufauvre J., Corbara B., Delbac F. and Blot N. 2013. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology* 140, 1346–1356

Ruiz-Gonzalez M.X. and Brown M.J.F., 2006. Males vs workers: testing the assumptions of the haploid susceptibility hypothesis in bumblebees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 501–509.

Rutrecht S.T., Klee J. and Brown M.J.F. 2007. Horizontal transmission success of *Nosema bombi* to its adult bumble bee hosts: effects of dosage, spore source and host age. *Parasitology* 134: 1719–1726.

Rutrecht S.T. and Brown M.J. 2008. Within colony dynamics of *Nosema bombi* infections: disease establishment, epidemiology and potential vertical transmission. *Apidologie* 39: 504–514

Rutrecht S.T. and Brown M.J.F. 2009. Differential virulence in a multiple-host parasite of bumble bees: resolving the paradox of parasite survival? *Oikos* 118: 941-949

Ruz, L. 2002. Bee pollinators introduced to Chile: a review. IN: Kevan, P. & Imperatriz Fonseca, V.L. (eds) - Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment / Brasília. p.155-167.

Sadd B.M. 2011. Food-environment mediates the outcome of specific interactions between a bumblebee and its trypanosome parasite. *Evolution* 65: 2995–3001.

Sagastume S., del Águila C., Martín-Hernández R., Hige M. and Henriques-Gil N. 2011. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees. *Environmental Microbiology* 13: 84–95.

Sagastume S., Martín-Hernández R., Higes, M. and Henriques-Gil N. 2013. Ribosomal gene polymorphism in small genomes: analysis of different 16S rRNA sequences expressed in the honeybee parasite *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 61: 42–50

Sagastume S., Martín-Hernández R., Higes, M. and Henriques-Gil N. 2015. Genotype diversity in *Nosema ceranae*, parasite of honeybees: Multi-strain isolates, cryptic sex or both? En: *Dinamismo Evolutivo en Genomas Reducidos: Análisis Genético Molecular del Microsporidio Nosema ceranae*. Tesis Doctoral de Soledad Sagastume. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2015

Salvarrey S., Arbulo N., Santos E. e Invernizzi C. 2013. Cría artificial de abejorros nativos *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* (Hymenoptera, Apidae). *Agrociencia Uruguay* 17 (2): 75-82

Santos E., Arbulo N., Salvarrey S. and Invernizzi C. 2013. First study of distribution of species of the genus *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) in Uruguay. XXXXIII International Apimondia Congress. Kiev, Ucrania. 2013

Santos E., Díaz R. and Mendoza Y. 2014. Valor económico del servicio de polinización realizado por la entomofauna en la horticultura de Uruguay. II Jornadas interdisciplinarias de Biodiversidad y Ecología. Rocha, Uruguay, 2013

Schmid-Hempel P. 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften* 88: 147-158

Schmid-Hempel, P. 2011. Evolution Parasitology. The integrated study of infections, immunology, ecology and genetics. Oxford University Press Inc. New York, USA. 516 p

Schmid-Hempel P. and Schmid-Hempel R. 1993. Transmission of a pathogen in *Bombus terrestris*, with a note on division of labour in social insects. Behavioural Ecology and Sociobiology 33: 319-327

Schmid-Hempel R. and Schmid-Hempel P. 1998. Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. Functional Ecology 1998 12(1):22-30

Schmid-Hempel R., Eckhardt M., Goulson D., Heinzmann D., Lange C., Plischuk S., Escudero L.R., Salathé R., Scriven J.J. and Schmid-Hempel, P. 2014. The invasion of southern South America by imported bumblebees and associated parasites. Journal of Animal Ecology 83 (4): 823–837

Shafer A.B., Williams G.R., Shutler D., Rogers R.E. and Stewart D.T. 2009. Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and a host-switch. Journal of Parasitology 95: 198–203

Shykoff J.A. and Schmid-Hempel P. 1991. Incidence and effects of four parasites in natural populations of bumble bees in Switzerland. Apidologie 25: 117-125

Singh R., Levitt A.L., Rajotte E.G., Holmes E.C., Ostiguy N., van Engelsdorp D., Lipkin W.I., de Pamphilis C.W., Toth A.L. and 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): 1-15

Sokolova Y.Y., Sokolov I.M. and Carlton C.E. 2010. Identification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA). Journal of Invertebrate Pathology 103: 71–73

Solter L.F. 2008. Microsporidia (Phylum Microsporida). In Encyclopedia of Entomology. Capinera J. L. (Ed.). Second Edition. Springer Science+Business Media B.V. pp 2380-2383

Stokstad E. 2007. The case of empty hives. Science 316 (5827): 970-972

Stout J. C. and Morales C.L. 2009. Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie* 40: 388–409

Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* 24(8): 1596-1599.

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

Tay W.T., O'Mahony E.M. and Paxton R. J. 2005. Complete rRNA Gene Sequences Reveal that the Microsporidium *Nosema bombi* Infects Diverse Bumblebee (*Bombus* spp.) Hosts and Contains Multiple Polymorphic Sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(6): 505–513

Teixeira E.W., Santos L.G., Sattler A., Message D., Alves M.L., Martins M.F., Grassi-Sella M.L. and Franco T.M. 2013. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 250–254

Tyler E.R., Adams S. and Mallon E.B. 2006. An immune response in the bumblebee, *Bombus terrestris* leads to increased food consumption. *BioMedCentral Physiology* 6 (6) doi:10.1186/1472-6793-6-6

van der Zee R., Gómez-Moracho T., Pisa L., Sagastume S., García-Palencia P., Maside J., Bartolomé C., Martín-Hernández R. and Higes M. 2014. Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*). *Environmental Microbiology Reports* 6 (4): 401 – 413

Van Engelsdorp D. and 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: S80–S95

Van Engelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpay D.R. and Pettis J.S. 2009. Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 4 (8): e6481

van Zweden J. S. and d'Etterre P. 2010. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. En: *Insects hydrocarbons: biology,*

biochemistry and chemical ecology. Eds. Blomquist G.J. and Bagnères A-G. Cambridge University Press. pp 222-243.

Vanbergen A. J. and the Insect Pollinators Initiative. 2013. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11: 251–259

Williams P. H. and Osborne J.L. 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie* 40: 367–387

Woolhouse M. E.J., Webster J.P., Domingo E., Charlesworth B. and Levin B.R. 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics* 32: 569 – 577

Woolhouse M.E.J. Haydon D.T and Antia R. 2005. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 238–244

Xu Y. and Weiss L.M. 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *International Journal of Parasitology* 35: 941–953