

Una aproximación al estudio de la comunidad microbiana de las abejas melíferas

Lic. Loreley Castelli

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA

Área Biología, Subárea Microbiología

Orientador: Dra. Karina Antúnez

Co-orientador: Dr. Pablo Zunino

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal: Dra. Claudia Etchebehere, Dra. Susana Castro, Dra. Fernanda Azpiroz

Este trabajo fue financiado por PEDECIBA y por la Agencia de Investigación e

Innovación (ANII)

Montevideo, 2016

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, (Roque y Yenis) y mis hermanas (Dahiana y Alexandra) por apoyarme en todas mis desiciones, guiarme y por siempre estar.

A mi abuela Olga por el apoyo incondicional.

A Karina, Ciro y Pablo por confiar en mí y por permitirme progresar en la Ciencias y en la Apicultura.

A la Colonia por su ayuda en las tareas del laboratorio, sobre todo a Belen.

A Melisa Garrido, Martin Porrini y Martin Eguaras por apoyarme y guiarme en los ensayos de mi tesis realizados en Mar del Plata.

A Hector Romero por brindarme sus conocimientos en el análisis de las secuencias de ADN.

A Sebastian Díaz, Carlos Silva y Gustavo Ramallo por el apoyo en la colección de muestras a campo y la ayuda en la cria de abejas en el laboratorio.

A la ANII y a la CAP por otorgarme becas de investigación las cuales fueron imprescindibles para seguir con mi formación.

A PEDEBICA por formar parte del programa de posgrado en el cual me formé.

RESUMEN

Las abejas melíferas son los principales insectos polinizadores de cultivos agrícolas y de plantas silvestres, además de elaborar diversos productos (miel, polen o propóleos) ampliamente utilizados por el hombre desde la antigüedad. Durante los últimos años se han reportado episodios de despoblación de colmenas que preocupan no solo a los apicultores, sino a todos los productores agrícolas. Las principales causas son la intoxicación con agroquímicos, desnutrición (asociada a las pérdidas de fuentes de néctar y polen por el crecimiento en la extensión de monocultivos) y la presencia de patógenos (*Varroa destructor*, virus ARN, *Nosema ceranae*).

Las abejas poseen mecanismos sociales e individuales de defensa frente a patógenos. Una de estas líneas es la microbiota intestinal, que puede modular el sistema inmune y fortalecer las barreras epiteliales, limitando el contacto de los patógenos con el epitelio.

La hipótesis del presente trabajo plantea que los primeros estadios de desarrollo de las abejas tienen una microbiota intestinal variable, transitoria, que se estabiliza durante el desarrollo. Esta comunidad es influenciada por factores externos, como las variaciones estacionales, que generan cambios en las fuentes de polen y néctar. Las alteraciones de esta microbiota pueden tener consecuencias en el sistema inmune del individuo, así como en el desarrollo de los patógenos. El objetivo general de este trabajo consistió en profundizar en el conocimiento de la comunidad microbiana de las abejas melíferas y analizar su variación asociada al desarrollo de la abeja, a la nutrición así como a la infección por patógenos.

En una primera etapa se analizó la estructura y composición de la microbiota en abejas durante las distintas etapas de su metamorfosis (huevos, larvas, pupas y abejas adultas), así como su variación estacional. Para este análisis se emplearon las técnicas de DGGE (*Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante*) y secuenciación masiva (*Illumina MiSeq*). Se encontró que los estadios tempranos de desarrollo poseen una comunidad microbiana variable, estableciéndose en los estadios tardíos. El núcleo de esta comunidad está formado por cinco grupos de bacterias: *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Bartonella*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Este núcleo se mantiene durante el año, con variaciones en la abundancia de estos géneros en diferentes estaciones.

Por otro lado, se empleó un sistema de cría de abejas en laboratorio para evaluar el efecto de la dieta (pan de polen polifloral y monofloral (de *Eucalyptus grandis* (*E. grandis*)) en la comunidad microbiana de las abejas, su sistema inmune y su influencia en la infección por *N. ceranae*. La alimentación con pan de polen polifloral generó un aumento en la abundancia de bacterias potencialmente benéficas (*Lactobacillus* spp. o *Bifidobacterium* spp.) así como una mayor expresión de genes vinculados a la inmunidad, respecto a la alimentación con pan de polen de *E. grandis*. Así mismo, la alimentación con pan de polen polifloral disminuyó la infección por *Nosema* spp.

Estos resultados comprueban las hipótesis planteadas sugiriendo que la microbiota cumple un rol vital en la salud de las abejas melíferas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
ÍNDICE.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Rol de la abeja melífera en los ecosistemas	7
1.2. Características de las abejas melíferas.....	7
1.3. Apicultura en Uruguay	8
1.4. Despoblación de colmenas	9
1.4.1. <i>Varroa destructor</i>	9
1.4.2. <i>Paenibacillus larvae</i>	10
1.4.3. Virus.....	10
1.4.4. <i>Nosema apis</i> y <i>Nosema ceranae</i>	10
1.5. Nosemosis.....	11
1.6. Estrategias para incrementar la producción de miel	13
1.7. Nutrición en abejas melíferas.....	13
1.8. Sistema inmune en abejas melíferas.....	15
1.9. Comunidad microbiana intestinal en abejas melíferas	17
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
2.1. Hipótesis.....	19
2.2. Objetivo General	19
2.3. Objetivos específicos	19
3. CAPÍTULO 1: Estructura y composición de la comunidad microbiana de las abejas melíferas	20
3.1. Materiales y métodos	20
3.1.1. Muestras a emplear	20
3.1.2. Procesamiento de las muestras de abejas	21
3.1.3. Extracción de ADN bacteriano.....	21
3.1.4. Análisis de la comunidad microbiana mediante PCR-DGGE	22

3.1.5.	Análisis de la comunidad mediante secuenciación masiva	23
3.1.6.	Análisis estadístico.....	27
3.2.	Resultados.....	28
3.2.1.	Puesta a punto de PCR- DGGE.....	28
3.2.2.	Análisis de la comunidad bacteriana durante el desarrollo	29
3.2.3.	Análisis de la comunidad microbiana a lo largo de un año ¡Error! Marcador no definido.	
3.3.	Discusión	42
4.	CAPÍTULO 2: Influencia de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas melíferas, en su sistema inmune y en la susceptibilidad a patógenos	44
4.1.	MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1.1.	Diseño experimental I: Rol de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en su sistema inmune	44
4.1.2.	Diseño experimental II: Rol de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en la susceptibilidad a patógenos.....	47
4.1.3.	Análisis de supervivencia de las abejas	50
4.1.4.	Caracterización del pan de polen.....	50
4.1.5.	Análisis de la diversidad de la comunidad microbiana intestinal.....	51
4.1.6.	Cuantificación bacteriana absoluta.....	51
4.1.7.	Respuesta inmune de las abejas	52
4.2.	RESULTADOS	54
4.2.1.	Ensayo experimental I: Rol de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en su sistema inmune.....	54
4.2.2.	Ensayo experimental II: Rol de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en la susceptibilidad a patógenos.....	69
4.3.	DISCUSIÓN	83
5.	CONCLUSIONES	86
6.	PERSPECTIVAS	87
7.	REFERENCIAS.....	88

La tesis se dividió en dos capítulos:

1. En el primer capítulo se propuso analizar la comunidad microbiana de los primeros estadios de desarrollo de las abejas, planteándose como hipótesis que esta microbiota es variable, transitoria estabilizándose durante el desarrollo.

Por otro lado, se planteó que la comunidad microbioana de las abejas es influenciada por factores externos, como las variaciones estacionales, que generan cambios en las fuentes de polen y néctar. Las muestras empleadas en este capítulo para el estudio de las comunidades microbiana se colectaron de colmenas pertenecientes a un apiario experimental en INIA La Estanzuela.

2. Una vez obtenido los resultados del primer capítulo, se planteo para el segundo capítulo de este trabajo analizar como varia la comunidad microbiana intestinal de las abejas en base a diferentes regímenes nutricionales de polen y como influye estas variaciones en el sistema inmunológico de estos insectos.

Paralelamente, en el mismo capítulo se planteo estudiar como influyen diferentes regímenes nutricionales en base de polen en la comunidad microbiana intestinal en abejas y en la susceptibilidad a patógenos, en particular a infecciones por el microsporidio *Nosema ceranae*.

En ambos capítulos, el estudio de la estructura y composición de las comunidades microbianas se realizaron empleando las técnicas de DGGE (*Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante*) y Secuenciación masiva (*Illumina*).

El análisis de la expresión de determinados genes inmunes de la abeja se evaluo por PCR cuantitativa, y por ultimo el estudio del desarrollo de *Nosema ceranae* se realizó por recuento de esporas en intestino individuales por microscopia óptica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ROL DE LA ABEJA MELÍFERA EN LOS ECOSISTEMAS

Las abejas melíferas son los principales insectos polinizadores de cultivos y plantas silvestres, favoreciendo directamente la producción de alimentos así como el mantenimiento de la biodiversidad vegetal (Morse y Calderone, 2000; Bascombe *et al.*, 2006; Fontaine *et al.*, 2006). Muchas especies de cultivos, tales como los manzanos, guayabos, kiwi y melón, dependen exclusivamente de la polinización entomófila, y muchos otros se ven favorecidos en la calidad y cantidad de los frutos obtenidos (Klein *et al.*, 2007; Aizen *et al.*, 2009; Bradbear, 2009).

Además de su imprescindible función polinizadora, las abejas elaboran una serie de productos como miel, jalea real, propóleos, apitoxina, polen y cera, que han sido utilizados tanto en la salud como en la alimentación por el hombre desde el siglo XV (Aizen *et al.*, 2009; Cordara, 2005).

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS ABEJAS MELÍFERAS

Las abejas *Apis mellifera* son insectos sociales que viven juntos en comunidades (colonias) conteniendo decenas de miles de individuos. Cada colonia posee tres castas o grupos de individuos: una única reina, la cual puede vivir varios años, está especializada en la reproducción y puede poner hasta 2.000 huevos por día (Page and Peng, 2001); zánganos, cuya única función es fecundar a la reina, y obreras estériles, encargadas de realizar el resto de las tareas de la colonia (limpieza, cuidado y alimentación de las crías, colecta de néctar y polen, entre otras) (Ament *et al.*, 2010). La esperanza de vida de las obreras varía estacionalmente desde 3 a 4 semanas en el verano a más de 6 meses en el invierno (Omholt and Amdam, 2004).

El ciclo de vida de una abeja comienza cuando la reina coloca un huevo en una celda de cera. Las reinas almacenan más de cinco millones de espermatozoides dentro de su cuerpo (en la espermateca), lo que les permite ir depositándolos durante toda su vida después de un único vuelo nupcial. Los huevos que son fertilizados van a dar lugar a obreras y los que no, darán lugar a zánganos (partenogénesis) (Ament *et al.*, 2010).

El desarrollo de estos insectos consta de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adultos. La etapa de huevo dura tres días y luego eclosionan dando lugar a una larva que es alimentada con una mezcla de polen y miel por las nodrizas. Transcurridos unos 6 días, la celda se cubre con una fina capa de cera (opérculo), y la larva da lugar a una pupa. En esta etapa el individuo no se alimenta durante 7-10 días hasta emerger como insecto adulto.

Durante las primeras dos o tres semanas de vida, las abejas jóvenes (abejas nodrizas) se encargan de cuidar a las crías, entre otras tareas, dentro de la colmena. Luego transitan a abejas forrajeras o pecoreadoras (abejas más viejas) que salen a coleccionar néctar o polen (Ament *et al.*, 2010; Winston, 1987).

La determinación del nacimiento de una obrera o reina, se basa fundamentalmente en la nutrición. El huevo destinado a una futura reina recibe alimento de alta calidad (jalea real) durante todo el ciclo de su desarrollo (16 días) (Page and Peng, 2001). Por el contrario, las larvas que darán lugar a obreras son alimentadas con jalea real durante sus primeros tres días y luego se las alimenta con polen y néctar por el resto de sus vidas (Omholt and Amdam, 2004).

1.3. APICULTURA EN URUGUAY

La apicultura en Uruguay nace en 1834, cuando Bernardino Rivadavia (ex presidente de Argentina) introdujo la primera colonia de *Apis mellifera* (Cordara, 2005). Actualmente, el sector apícola cuenta con cerca de 3.200 apicultores inscriptos en el Registro Nacional de Propietarios Nacional de Colmenas (RNPC, 2015), y poseen aproximadamente 590.000 colmenas. Los departamentos con mayor número de colmenas son Soriano (75665), Colonia (68952), Paysandú (68155) y Río Negro (66947) (www.mgap.gub.uy), correspondientes a la región litoral oeste del país. El 99% de la miel que se produce se exporta principalmente a Estados Unidos, Alemania y España. En 2014, las exportaciones de miel generaron divisas al país de 39 millones de dólares (MGAP, 2015). Si bien el número de colmenas en nuestro territorio se ha mantenido relativamente constante en el tiempo, de acuerdo a una encuesta nacional de pérdidas de colmenas en la temporada 2013-2014 se perdieron el 30% de las mismas (Maggi *et al.*, 2016). Esto indica que la apicultura en nuestro país está amenazada, ya que los apicultores deben hacer cada vez mayor esfuerzo económico y de trabajo para

mantener estable el número de colmenas y la producción de miel (MGAP, 2015; Maggi *et al.*, 2016).

1.4. DESPOBLACIÓN DE COLMENAS

Entre los principales factores que inducen pérdidas de colmenas se encuentran la intoxicación con pesticidas y herbicidas, y la desnutrición vinculada al incremento de monocultivos. Este incremento genera una disminución de la diversidad polínica y nectarífera disponible para las abejas, causando desnutrición. El tercer factor importante en estas pérdidas lo constituyen las infecciones por diferentes parásitos y patógenos como el ácaro *Varroa destructor*, el microsporidio *Nosema ceranae*, la bacteria *Paenibacillus larvae* y diversos virus de ARN (Cox-Foster *et al.*, 2007; Brodschneider and Crailsheim, 2010; Forsgen and Fries, 2010; Fries, 2010; Neumann and Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010; Goulson *et al.*, 2015).

1.4.1. Varroa destructor

La principal amenaza para las abejas melíferas es *Varroa destructor*, un ectoparásito que se reproduce en las celdas de las abejas y que afecta tanto a larvas como al individuo adulto (Rosenkranz *et al.*, 2010). Las larvas y pupas constituyen las etapas de desarrollo más sensibles a dicho ácaro. A nivel individual, la pérdida de hemolinfa durante el desarrollo ontogénico dentro de la celda de cría lleva a una reducción significativa del peso de la abeja que se está desarrollando. Los zánganos parasitados pueden perder entre el 11 al 19% de su peso seco. Las abejas pecoreadoras que fueron parasitadas durante su desarrollo, comienzan antes con su actividad de forrajeo y poseen una vida significativamente reducida (De Jong *et al.*, 1982; Duay *et al.*, 2003; Amdam *et al.*, 2004). A nivel colonial, los zánganos tienen una posibilidad significativamente menor de apareamiento, y aquellas colonias infectadas son menos productivas (Duay *et al.*, 2002; Fries *et al.*, 2003).

Además del daño directo que causa, *V. destructor* puede actuar como vector de virus u otros microorganismos, pudiendo resultar letal para la colonia (Morse *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2004; Hubert *et al.*, 2015). El ácaro se encuentra ampliamente distribuido en Uruguay, por lo que los productores deben aplicar al menos un tratamiento de acaricida al año con el fin de no perder sus colmenas (Anido *et al.*, 2015).

1.4.2. *Paenibacillus larvae*

Las abejas melíferas también pueden sufrir infecciones bacterianas, como es el caso de la Loque Americana, enfermedad causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*. *P. larvae* forma esporas altamente resistentes que pueden sobrevivir en panales o material apícola durante muchos años. Cuando las larvas ingieren alimento contaminado con esporas, éstas dan lugar a células vegetativas en el intestino larval y rápidamente ocasionan la muerte de la larva (Genersch, 2010). Es una enfermedad altamente contagiosa, que puede generar la muerte de la colmena y afectar rápidamente a todo un apiario o apiarios vecinos (Bamrick and Rothenbuhler, 1961; Genersch, 2010).

En un relevamiento realizado en el año 2003 se pudo comprobar que esta bacteria se encontraba ampliamente distribuida en el país con una prevalencia del 51% (Antúnez *et al.*, 2004). Gracias a intensas actividades de divulgación con apicultores, a las medidas de control sugeridas por el MGAP y al desarrollo de estrategias naturales de prevención, se logró reducir la prevalencia a un 2% en 2011 (Anido *et al.*, 2015).

1.4.3. *Virus*

Las abejas melíferas son blancos de más de 18 virus de ARN, como el virus de la parálisis aguda (ABPV), virus de la celda real negra (BQCV), virus de las alas deformadas (DWV), virus de la cría ensacada (SBV) (de Miranda *et al.*, 2010; Genersch and Aubert, 2010). Muchos de estos virus se asocian con síntomas que pueden ser fácilmente reconocibles por el apicultor, pero todos pueden permanecer de forma asintomática en colmenas aparentemente sanas (Genersch and Aubert, 2010). Estos virus se encuentran presentes y ampliamente distribuidos en Uruguay, estando asociados a la presencia del ácaro *V. destructor* (Antúnez *et al.*, 2005; Antúnez *et al.*, 2006; Anido *et al.*, 2015). En particular, el DWV es uno de los virus con mayor relevancia ya que se lo ha asociado a la pérdida de colmenas en diferentes países (Highfield *et al.*, 2009).

1.4.4. *Nosema apis* y *Nosema ceranae*

Nosema apis y *Nosema ceranae* son dos microsporidios causantes de Nosemosis en abejas adultas. En Uruguay el microsporidio predominante es *N. ceranae*, con una

prevalencia estimada en 2011 de 15% (Invernizzi *et al.*, 2009; Antúnez *et al.*, 2015; Anido *et al.*, 2015).

1.5. NOSEMOSIS

Los microsporidios (clase Microsporea) son organismos eucariotas unicelulares, parásitos intracelulares obligados, productores de esporas. Pueden colonizar tanto vertebrados como invertebrados, y se caracterizan por presentar fibras polares en sus esporas (Graczyk *et al.*, 2007). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y comprenden más de 1200 especies, de las cuales al menos 14 de ellas son peligrosas para los seres humanos.

El primer microsporidio detectado infectando el intestino de abejas melíferas fue *Nosema apis* (Zander, 1909). Durante décadas se consideró que este microsporidio era el único agente causal de la Nosemosis (Fries, 2010). En 1996, una nueva especie de microsporidio fue detectada en la abeja asiática *Apis cerana*, y se denominó *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 1996). En 2005, se reportó la primera infección natural de *N. ceranae* en colmenas de *A. mellifera* de Taiwan (Huang *et al.*, 2005). Poco después, la infección por *N. ceranae* fue reportada en Europa (Higes *et al.*, 2006; Paxton *et al.*, 2007), Estados Unidos (Chen *et al.*, 2008), China (Liu *et al.*, 2008) y América del Sur (Klee *et al.*, 2007, Sarlo *et al.*, 2008, Invernizzi *et al.*, 2009, Rodríguez *et al.*, 2012). En Uruguay, la Nosemosis está presente desde 1990 (Invernizzi *et al.*, 2009). Desde ese momento, el diagnóstico se realizaba mediante observación de esporas en homogeneizados de abejas empleando microscopía de luz, y la presencia de esporas se asumía como indicador de Nosemosis causada por *N. apis*. En 2009, Invernizzi *et al.*, 2009 realizaron la identificación molecular de estas esporas, detectando la presencia de *N. ceranae* en lugar de *N. apis*. Trabajos posteriores corroboraron que *N. ceranae* es el único microsporidio que afecta a las abejas en Uruguay (Antúnez *et al.*, 2015; Anido *et al.*, 2016). Actualmente *N. ceranae* se encuentra mundialmente distribuido mientras que la prevalencia de *N. apis* va en decremento (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2012).

El ciclo de infección con *Nosema* spp. comienza cuando las abejas ingieren alimentos o beben agua contaminada con esporas (Chen *et al.*, 2008, Webster *et al.*, 2004). Éstas germinan en el intestino medio de las abejas liberando su filamento tubular

para trasladar su esporoplasma (el parásito infeccioso) a las células epiteliales del intestino donde se producirá un mayor número de esporas, liberándose a través de las heces y generando nuevas fuentes de infección para la colonia (Chen *et al.*, 2008). Una vez expulsadas, pueden permanecer viables en el campo durante más de un año (Fries, 1993). Una abeja puede albergar millones de esporas nuevas en su intestino en unas pocas semanas después de la infección inicial (Bailey and Ball, 1991). Las heces de los individuos enfermos contienen grandes números de esporas, y constituyen las principales fuentes de infección. De esta manera, *Nosema* spp. afecta las funciones digestivas de la abeja, produciendo desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad de estas (Fries, 1997; Hornitzky, 2008). A nivel colonial, la infección por ambas especies de *Nosema* resulta en una disminución de la producción de miel, en la actividad de forrajeo y por otro lado en la productividad de la polinización (Bourgeois *et al.*, 2010). Las abejas infectadas rápidamente mueren, generalmente fuera de la colmena, sin claros síntomas clínicos (Chen *et al.*, 2009, Forsgren and Fries, 2010; Higes *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007). El único síntoma típico de la infección por *N. apis* es la diarrea, que no está presente en casos de infección por *N. ceranae* (Faucon, 2005; Mayack and Naug, 2009).

Los ciclos de desarrollo de ambos microsporidios presentan diferencias. Mientras que el ciclo de desarrollo de *N. apis* se lleva a cabo en 5 días, *N. ceranae* completa su ciclo en 3 días. Las células epiteliales intestinales se convierten en células infectadas a los 3 días de la infección y el insecto generalmente muere dentro de los 9 días. *N. ceranae* han sido detectado no solo en las células epiteliales intestinales sino también en el sistema de túbulos de Malpighi, glándulas salivales y en la grasa corporal (Chen and Huang, 2010).

Reportes recientes demuestran que *N. ceranae* presenta mecanismos más desarrollados para adaptarse a los cambios de temperaturas en comparación con *N. apis*. A temperatura a las cuales se ve limitado el desarrollo de hongos (25 y 37 °C), *N. ceranae* logra completar su ciclo mientras que *N. apis* es inhibido. A una temperatura óptima de 33°C, *N. ceranae* puede destruir entre 2 a 3 veces más células epiteliales intestinales que *N. apis* (Fenoy *et al.*, 2009).

El uso de productos farmacológicos para el control o tratamientos de la Nosemosis, especialmente la fumagilina, no son recomendados ya que su uso deja residuos en la miel, pudiendo afectar su calidad para el consumo. En particular en Uruguay, su uso está restringido únicamente a los criaderos de reinas (MGAP, 2010).

Actualmente se están evaluando estrategias alternativas de tratamiento, basadas en el uso de productos naturales, como el Protofil y Api-Herb (Chioveani *et al.*, 2004; Nanetti, 2009).

1.6. ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE MIEL

Una práctica apícola muy común en Uruguay es el traslado de colmenas a plantaciones de *Eucalyptus* spp. a fines del verano, con el fin de aprovechar su floración tardía (en comparación al resto de los cultivos) y extender así la temporada productiva.

La superficie dedicada a las forestaciones de *Eucalyptus* spp. en nuestro país se ha incrementado de 422.546 hectáreas en 1999 a 726.323 en el 2013 (Dirección General Forestal, www.mgap.uy), y ocupan desde el 2013 el 39% del área forestada, con una proporción considerable de *Eucalyptus grandis* especialmente en las regiones Centro Norte y Litoral Oeste (MGAP, 2015). En condiciones climáticas favorables un apicultor puede producir 50 kg de miel por colmena en estas forestaciones, ya que constituyen una importante fuente de néctar y polen para las abejas (Invernizzi *et al.*, 2009). Sin embargo, dado que se trata de polen de un único origen botánico (monocultivo), las abejas se someten a un fuerte estrés nutricional. En estas condiciones se ve favorecido el desarrollo del *N. ceranae* (Invernizzi *et al.*, 2011). Si las colmenas son retiradas de la forestación inmediatamente después de culminada la floración, normalmente sobreviven el invierno. Sin embargo, si permanecen en dichas forestaciones, las colmenas se pierden (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2012).

1.7. NUTRICIÓN EN ABEJAS MELÍFERAS

El desarrollo y supervivencia de las colonias de abejas melíferas está íntimamente relacionado con la disponibilidad de nutrientes en el ambiente (Brodschneider y Craislheim., 2010; Keller *et al.*, 2005; Haydak, 1970). El néctar colectado desde las plantas por las abejas pecoreadoras constituye la fuente natural de carbohidratos para estos insectos, el cual es trasladado hacia las colmenas y almacenado en celdas (Brodschneider y Craislheim, 2010). La transformación del néctar a miel, se produce mediante la reducción del contenido de agua (18%), quedando compuesto al final por un promedio de 38% fructosa, 31% glucosa y otros di-trisacaridos (Doner,

1977). Esta transformación es gradual y comienza desde el vuelo de retorno de las abejas a la colmena (Nicolson y Human, 2008).

Otro de los compuestos que las abejas colectan durante la actividad del pecoreo, es el polen, el cual constituye la fuente natural de proteínas, minerales, grasas, lípidos, aminoácidos y vitaminas (Decourtye *et al.*, 2010; Naug, 2009; Herbert, 1992). Es utilizado para alimentar y promover el desarrollo de larvas y abejas jóvenes suministrando elementos estructurales para los músculos, glándulas y otros tejidos, así como para la producción de jalea real. Cuando las colonias están creciendo activamente aumentando la población de la cría, o durante períodos de fuerte producción de cera (por ejemplo, durante fuerte flujo de néctar), la demanda de polen es alta (Somerville, 2000).

Las abejas acumulan el polen en los pelos de la cabeza y del cuerpo en cada búsqueda de alimentos, y se consolida utilizando las patas delanteras, mezclándolo con soluciones azucaradas obtenidas a partir de la cosecha. Esta mezcla pegajosa se envasa en canastas de polen ubicadas en las patas traseras llamadas corbículas. Una vez que la abeja regresa a la colmena, los gránulos de pólenes corbiculares son envasados herméticamente en celdas de cera y se convierten en pan de polen, una densa mezcla de nutrientes de polen, miel y microorganismos. El almacenamiento de polen es crítico ya que proporcionan a la abeja los nutrientes esenciales durante el invierno o períodos de escasez de polen (Anderson *et al.*, 2013; Loper *et al.*, 1980; Pain y Maugenet, 1966). Este pan de polen es utilizado para elaborar jalea real en las glándulas salivales (hipofaríngeal) y es distribuido vía trofalaxía para el crecimiento larval y de otros miembros de la colonia (Anderson *et al.*, 2014).

El pan de polen almacenado en la colmena generalmente difiere del polen colectado directamente desde la flor (polen corbicular), por estar formado por néctar y secreciones de glándulas. El producto final de polen almacenado es altamente ácido (pH= 4) y contiene entre el 40 al 50% de azúcares simples (Anderson *et al.*, 2011; Nicolson, 2011).

Vásquez and Olofsson, (2009) lograron aislar e identificar microorganismos presentes en el pan de polen, sugiriendo que el proceso fermentativo que sufre el polen que ingresa a la colmena es realizado por la comunidad bacteriana intestinal de la abeja, que son añadidas al polen mediante el néctar regurgitado.

Por otro lado, Anderson *et al.*, (2014), indicaron que la comunidad microbiana presente en el pan de polen disminuye con el transcurso del tiempo ya que no sería un

medio adecuado para el crecimiento de microorganismos. Estos autores sugieren que el pan de polen es un ambiente gobernado ampliamente por adiciones no microbianas tales como néctar, miel y secreciones glandulares (Herbert and Shimanuki, 1978; Human and Nicolson, 2006; Judd, 2011; Nicolson, 2011).

El nivel mínimo de proteína cruda presente en el polen requerido por las abejas varía entre el 20 y 25% (Somerville, 2005). Este porcentaje así como la diversidad de especies presentes en el polen juegan un rol clave en la nutrición de las abejas (Alaux *et al.*, 2010). Cuanto más diversa es la dieta, mayor será la probabilidad de obtener todos los aminoácidos esenciales.

La composición, calidad y cantidad del polen influyen sobre el metabolismo fisiológico de las abejas (Alaux *et al.*, 2011), reducen la sensibilidad a pesticidas (Wahl and Ulm, 1983), influye sobre la longevidad (Maurizio, 1950; Schmidt *et al.*, 1987), el desarrollo de las glándulas hipofaringales (Standifer, 1967; Pernal and Currie, 2000) y la actividad de la glucosa oxidasa (Alaux *et al.*, 2010). A la vez, el adecuado suministro de polen permite mantener una inmunocompetencia normal (Alaux *et al.*, 2010), definida como la capacidad de un organismo de montar una respuesta inmune (Wilson-Rich *et al.*, 2008) lo que se asocia a una mayor tolerancia a bacterias (Rinderer *et al.*, 1974), microsporidios (Rinderer *et al.*, 1977) y virus (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2010). En esta línea, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se ha visto que colmenas con mayor diversidad de polen presentaron menor nivel de infección por virus y *N. ceranae* (Antúnez *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta la importancia del néctar y del polen para el desarrollo y la supervivencia de las colonias de abejas, las alteraciones de las áreas de forrajeo asociadas a la intensificación de la agricultura, pueden tener un fuerte impacto en la salud de las abejas (Decourtye *et al.*, 2010; Naug, 2009).

1.8. SISTEMA INMUNE EN ABEJAS MELÍFERAS

Como insectos eusociales, las abejas realizan diferentes tareas de forma comunal, como la termorregulación, cuidado de la cría y la recolección de recursos para la alimentación. Estas actividades se ven favorecidas por la arquitectura, organización y proximidad entre los individuos dentro de una colonia (Schmid-Hempel, 1998). Sin embargo, estas mismas condiciones son ideales para la invasión y transmisión de

patógenos, favoreciendo la generación de epidemias (Cremer *et al.*, 2007). Para combatir estas infecciones, los insectos sociales han desarrollado mecanismos de defensas colectivos denominados “inmunidad social”. Esta es la primera barrera de defensa que deben enfrentar los patógenos (Cremer *et al.*, 2007; Evans and Spivak, 2010). Ejemplos de esta inmunidad son el comportamiento higiénico (las obreras remueven abejas adultas que mueren en la colonia o a las crías que están infectadas o parasitadas), o la fiebre social (las abejas obreras forman grandes agrupaciones que alcanzan temperaturas inhóspitas para el desarrollo de parásitos) (Simone-Finstrom *et al.*, 2014), entre otros.

Las abejas también presentan otros mecanismos de defensa que incluyen defensas mecánicas, fisiológicas e inmunes (Evans *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2008; Wilson-Rich *et al.*, 2008). Las barreras mecánicas incluyen la cutícula del insecto y el tejido epitelial, los cuales previenen a los microorganismos adherirse o ingresar al organismo, mientras que los inhibidores fisiológicos incluyen cambios en el pH y otras condiciones químicas del intestino del insecto (Crailsheim and Riessberger-Galle, 2001). Una vez que los patógenos logran evadir estas barreras activan la respuesta inmune innata celular y humoral del insecto.

La inmunidad de insectos muestra muchos paralelismos con la respuesta inmune innata de los seres humanos y otros vertebrados, que implican un conjunto diverso de acciones como la secreción de péptidos antimicrobianos, fagocitosis, melanización y la degradación enzimática de patógenos (Hoffmann, 2003; Hultmark, 2003). Los insectos carecen de respuesta inmune adaptativa. La respuesta humoral consiste de secreciones de diferentes péptidos antimicrobianos hacia la hemolinfa (Hoffmann, 2003). Se han detectado cuatro péptidos antimicrobianos en las abejas: defensinas (Casteels-Jonsson *et al.*, 1994), abaecinas (Casteels *et al.*, 1990), himenoptecinas (Casteels *et al.*, 1993) y apidecinas (Casteels *et al.*, 1989). Las abejas también producen lisozima, un factor no específico del sistema inmune sintetizado por las glándulas salivares de las abejas nodrizas (Bogdanov, 1997), que es activo frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas. La lisozima puede promover la expresión de otros péptidos antimicrobianos (Imler and Bulet, 2005).

Por otro lado, la respuesta inmune celular está formada por células inmunes como los hemocitos, granulocitos y plasmotocitos encargados de realizar las tareas de fagocitosis, encapsulación, nodulación y melanización de microorganismos y cuerpos extraños (Cristophides *et al.*, 2002; Wilson-Rich *et al.*, 2009).

Finalmente, una proteína importante vinculada a la organización social de los insectos con efectos pleiotrópicos sobre la división del trabajo y especialización de forrajeo, pero que también está vinculada a la defensa frente a patógenos, es la vitelogenina (Amdam y Omholt, 2003; Nelson *et al.*, 2007). La expresión de esta proteína se ha asociado con una mayor resistencia al estrés oxidativo ocasionado por *N. ceranae* (Seehuus *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007).

1.9. COMUNIDAD MICROBIANA INTESTINAL EN ABEJAS MELÍFERAS

Evans *et al.*, (2006) demostraron que en las abejas, las familias de genes vinculados a la inmunidad están fuertemente reducidas comparadas con *Drosophila* y *Anopheles*. Se ha propuesto que estas reducciones podrían estar compensadas con la presencia de una comunidad microbiana que cumplen funciones de defensa (Moran *et al.*, 2005; Gerardo *et al.*, 2010).

Los primeros estudios sobre la comunidad bacteriana intestinal de las abejas fueron realizados empleando técnicas dependientes de cultivos (Gilliam, 1997). El avance de la biología molecular y la utilización de técnicas independientes de cultivo desde reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hasta la secuenciación masiva, han permitido profundizar en el estudio de esta comunidad (Babendreier *et al.*, 2007; Jeyaprakash *et al.*, 2003; Mohr and Tebbe, 2006; Yoshiyama and Kimura, 2009; Sudakaran *et al.*, 2012). Actualmente se sabe que las abejas melíferas adultas tienen una comunidad microbiana intestinal conservada y característica, que desempeña funciones esenciales para la fisiología, biología, ecología y evolución del hospedero (Hamdi *et al.*, 2011). Esta microbiota está formada por un núcleo compuesto por cinco grupos de especies: *Lactobacillus* Firm 4, *Lactobacillus* Firm 5, *Bifidobacterium*, *Snodgrassella alvi* y *Gilliamella apícola*. (Kwong y Moran, 2016). Este núcleo, junto con las especies *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apim* y *Gluconobacter* spp. forman el grupo dominante, y representan el 95-99 % del total de la comunidad.

La conservación de la comunidad microbiana intestinal en diferentes áreas geográficas, como África del Sur (Jeyaprakash *et al.*, 2003), Alemania (Mohr and Tebbe, 2006) y Suiza (Babendreier *et al.*, 2007), sugiere que la misma se mantiene por transmisión entre individuos dentro de la colmena más que por adquisición selectiva de

microorganismos del ambiente externo (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Gilliam, 1997; Cox-Foster *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011). Sin embargo, la adquisición de microorganismos también puede darse a través del consumo de polen (Kacaniova *et al.*, 2004).

Powell *et al.*, (2014) desarrollaron un experimento en el cual se evaluó las posibles fuentes de transmisión y adquisición de la comunidad microbiana en las abejas. En este ensayo se observó que crías de abejas en estadios tardíos de pupa incubadas en laboratorio y en condiciones estériles, no lograban desarrollar la comunidad microbiana características incluso después de transcurridos 8 días, en comparación con aquellos individuos del mismo estadio pero expuestos a materiales provenientes de colmenas. Estas últimas desarrollaron una comunidad microbiana dominada por especies características entre 4 a 6 días.

Los microorganismos que forman parte de la comunidad microbiana intestinal pueden proveer protección a su huésped mediante tres mecanismos: 1) pueden producir compuestos químicos que poseen fuertes efectos directos sobre microorganismos antagónicos; 2) colonizar nichos vulnerables en o sobre los hospedadores y 3) excluir competitivamente desde el establecimiento exitoso del mismo para generar una infección o pueden interactuar con el sistema inmune y potenciar la resistencia frente a patógenos o parásitos (Kaltenpoth y Engl, 2014; Reeson *et al.*, 2003). En el caso de las abejas, se ha descrito que diversas bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus* principalmente) así como cepas de *Shingomonas* y *Escherichia coli* aisladas del intestino de abejas presentan efectos inhibitorios sobre *Paenibacillus larvae*, (Forsgren *et al.*, 2009; Yoshiyama y Kimura, 2009, Olofsson and Vasquez, 2008). A la vez, diferentes cepas del género *Bacillus* son capaces de inhibir el desarrollo de patógenos fúngicos como *Ascosphaera apis* (Gilliam *et al.*, 1988). Esta inhibición puede estar vinculada a la producción de sustancias antimicrobianas tales como ácido fórmico, láctico y acético; peróxido de hidrogeno, diacetilo, benzoato y bacteriocinas (Hamdi *et al.*, 2011).

Los diversos factores de estrés que afectan a las abejas ocasionan un desbalance en la comunidad bacteriana intestinal, lo que podría jugar un importante papel en la susceptibilidad a microorganismos y en la productividad (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2016; Hubert *et al.*, 2016).

Una adecuada nutrición permitiría un correcto balance en la comunidad microbiana intestinal de las abejas, lo cual sería esencial para el mantenimiento de la salud e inmunidad individual (Hamdi *et al.*, 2011).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

- 1- Los primeros estadios de desarrollo de las abejas melíferas tienen una comunidad microbiana intestinal variable transitoria, que se va estabilizando durante el desarrollo, hasta dar lugar a una comunidad microbiana conservada en individuos adultos.
- 2- La comunidad microbiana intestinal conservada puede ser influenciada por condiciones externas a la colmena, como las variaciones estacionales que generan cambios en las fuentes de polen y néctar
- 3- Estas alteraciones pueden tener consecuencias en el sistema inmune del individuo, así como en el desarrollo de los patógenos

2.2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo consiste en analizar la variación de la comunidad microbiana de las abejas melíferas asociada a la etapa de desarrollo, a la nutrición y a la infección por patógenos.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumplir con el objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1- Analizar la variación de la comunidad microbiana de las abejas melíferas durante las distintas etapas de su metamorfosis
- 2- Analizar la variación de la comunidad microbiana de las abejas melíferas adultas en diferentes estaciones climáticas (en un período de un año)
- 3- Analizar si la dieta (monofloral vs. polifloral) es capaz de alterar la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas así como el sistema inmune, y afectar el desarrollo de los patógenos

3. CAPÍTULO 1: ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS

Los objetivos de este primer capítulo consisten en conocer la composición y variaciones de la comunidad microbiana en las abejas melíferas durante su metamorfosis así como también durante un período de un año. El análisis de la comunidad microbiana se realizó extrayendo el ADN bacteriano de las diferentes muestras, y se analizaron mediante las técnicas de DGGE y secuenciación masiva. Este primer abordaje nos permitirá conocer si la etapa de desarrollo de *Apis mellifera* así como también las diferentes estaciones anuales inciden en su comunidad microbiana intestinal.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Muestras

Para el análisis de la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas se emplearon cinco colmenas de *Apis mellifera*, híbridos locales entre *A. m. scutellata*, *A. m. lingüística* y *A. m. mellifera*, localizadas en un apiario experimental pertenecientes al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA “La Estanzuela”, Colonia, Uruguay).

Con el fin de poner a punto la técnica de DGGE para analizar la diversidad, al inicio del estudio se colectaron 20 abejas nodrizas de una de las colmenas y se las procesó de forma individual.

Posteriormente se colectaron de cada colmena 20 individuos de cada estadio: huevos, larvas, pupas, abejas nodrizas y abejas pecoreadoras, con el fin de analizar la variación de la comunidad bacteriana durante el desarrollo.

Por último, de esas mismas colmenas se colectaron 20 abejas nodrizas una vez al mes durante un año, con el fin de evaluar la variación de la comunidad bacteriana intestinal a lo largo del tiempo.

Las muestras se colocaron en alcohol etílico 70% hasta su análisis.

3.1.2. *Procesamiento de las muestras de abejas*

Las muestras de abejas adultas (abejas nodrizas y pecoreadoras) se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en una solución de hipoclorito 1% durante tres minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada, para eliminar restos de dicha solución (Engel *et al.*, 2013; Dietemann *et al.*, 2013). Luego se extrajeron los intestinos de cada abeja y se colocaron en alcohol etílico 70%, utilizando pinzas estériles y bajo condiciones asépticas (Yoshiyama *et al.*, 2009).

3.1.3. *Extracción de ADN bacteriano*

La extracción de ADN de las muestras de huevos, larvas y pupas se realizó a partir del individuo entero, mientras que para las muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras se partió del intestino. El alcohol se descartó y las muestras se homogeneizaron en 700 μ l de solución de *buffer PBS (Phosphate-Buffered Saline)* utilizando una barilla de vidrio estéril.

Para el primer ensayo (puesta a punto de la técnica de DGGE) se realizó la extracción individual de ADN de 20 intestinos obtenidos de 20 abejas nodrizas, mientras que para los siguientes ensayos de esta tesis se realizaron *pooles* de 20 intestinos.

La extracción del ADN bacteriano intestinal, se llevó a cabo mediante un método orgánico propuesto por Zhou *et al.*, (1996). Para esto se añadieron a cada muestra 17,5 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 100 mM pH 8,0; Na-Fosfato 100 mM pH 8,0; NaCl 1,5 M; CTAB 1% (Hexadeciltrimetilamonio-bromuro), junto con 67,5 μ l de una solución de Proteinasa K (1 mg ml⁻¹) y se incubó 30 minutos a 37°C con agitación. Transcurrido dicho tiempo, se añadieron 1,9 ml de SDS 20% y se incubó durante dos horas a 65°C con agitación. Las muestras se centrifugaron a 6000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. Se agregó el mismo volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló cuidadosamente y se centrifugó a 10000 xg durante 10 minutos. Se colectó la fase superior acuosa y se transfirió a un nuevo tubo. La extracción con cloroformo/alcohol isoamílico se repitió tres veces, y posteriormente las muestras se centrifugaron a 3220 xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y con el fin de precipitar el ADN se agregó isopropanol (60% del volumen del sobrenadante) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, las

muestras se centrifugaron a 50000 xg a temperatura ambiente durante 30 minutos, se descartó cuidadosamente el sobrenadante, y el *pellet* se lavó con alcohol frío al 70%. El *pellet* se secó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 µl de agua pura para análisis durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos con agitación. El ADN obtenido se almacenó a -20°C.

3.1.4. Análisis de la comunidad microbiana mediante PCR-DGGE

El análisis de la comunidad bacteriana se realizó mediante PCR-DGGE (*Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante*) y secuenciación masiva, estudiando diferentes regiones del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal.

El PCR- DGGE consiste en la amplificación mediante PCR de un fragmento de ADN y la separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de desnaturalización química (urea-formamida). Esto permite separar fragmentos del mismo tamaño pero de diferentes secuencias. Como resultado, se obtiene un perfil de bandas, donde se puede considerar que cada banda representa un microorganismo. La información obtenida es cualitativa ya que no es confiable inferir resultados cuantitativos a partir de las intensidades de los patrones de bandas (Muyzer., 1999).

Los fragmentos de ADN sometidos a condiciones desnaturalizantes crecientes pueden permanecer en conformación de doble hebra hasta que ocurre su desnaturalización, momento en que las moléculas dejan de migrar.

Uno de los cebadores empleado en la amplificación debe incluir un segmento de 30 – 50 bases rico en GC en su extremo 5', ("grampa" de GC) que evita la desnaturalización completa del fragmento (Muyzer *et al.*, 1993). Variaciones en la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado ocasionan diferencias en las condiciones de desnaturalización, por lo que fragmentos de igual tamaño pero diferente secuencia van a migrar de forma diferente en el gel generando un perfil de bandas (Muyzer., 1999).

El ADN obtenido se empleó como molde para amplificar la región V6-V8 del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (280 pares de bases) (Heuer *et al.*, 1997). Cada reacción de PCR consistió de dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 2,5 mM, de cada primer 10 pmol (U968f:

CGCCCGCCGCGCGCGGCCGGCGGGGCGGGGGCACGGGGAACGCGAA;

L140lr: GCTGTGTACAAGACCCGAACCTTAC), ADN *Taq* polimerasa 2,5 U, *buffer*

1X y 0,5 µl de ADN, en un volumen final de 25 o 50 µl. El protocolo empleado para el PCR consistió de una pre-incubación inicial a 94°C por dos minutos, 35 ciclos de: 94°C por un min, 61°C por un min, 72°C por dos min y una extensión final de 72°C por 10 min (Heuer *et al.*, 1997).

Los productos de PCR obtenidos se analizaron en una primera instancia empleando diferentes gradientes de desnaturalización urea-formamida en gel de acrilamida al 6% (30-60; 40-60; 45-70) con el fin de encontrar el gradiente que permitiera la mejor discriminación de los patrones de bandas. Se seleccionó el gradiente 45-70 para los siguientes análisis. La corrida electroforética se realizó empleando el sistema *D-Code BioRad* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 70 V y 60°C durante 16 horas. Las bandas se tiñeron con GelRedTM y se visualizaron mediante un *scanner* de Imagenes Fuji Film Starion FLA 9000.

Las imágenes se analizaron mediante el Software *GelCompare II* (Applied Maths, USA). Los patrones de bandas se marcaron de forma automática y se corrigieron muestra a muestra, variando los valores de porcentajes de tolerancia y optimización. Estos parámetros corresponden a la libertad en el movimiento de la imagen y al porcentaje de distancia admitida entre dos bandas para reconocerlas como la misma banda, respectivamente. Posteriormente se calculó una matriz de similitud empleando el coeficiente de similitud “Dice”, el cual se basa en la posición de las bandas entre dos muestras. Se generaron agrupamientos en base a los patrones de bandas obtenidos empleando el método de inferencia filogenética *Neighbor Joining*.

3.1.5. Análisis de la comunidad mediante secuenciación masiva

El principio de las tecnologías de secuenciación (Illumina MiSeq paired-end) se basa en la detección de *dNTPs* (desoxiribonucleotico trifosfato) marcados fluorescentemente a una hebra de ADN, durante los ciclos de síntesis de ADN. Durante cada ciclo, en el punto de incorporación, los nucleótidos son identificados por excitación del fluoroforo. La diferencia crítica que posee con las secuenciaciones convencionales es que en vez de secuenciar un solo fragmento de ADN, la técnica de secuenciación masiva extiende este proceso sobre millones de fragmentos de forma paralela.

El *workflow* de Illumina incluye cuatro pasos (Figura 1):

- 1- *Preparación de la librería*: El ADN es fragmentado al azar, y los fragmentos son ligados a un adaptador en el extremo 5' y 3'. En esta etapa se realiza la reacción de fragmentación y ligación en un solo paso, lo cual aumenta la eficiencia. Los fragmentos son luego amplificados por PCR y purificados.
- 2- *Generación de agrupamientos*: Los fragmentos de ADN son cargados en un soporte sólido (placa) donde son capturados y unidos a la superficie mediante la presencia de *oligos* complementarios al adaptador. Cada fragmento se amplifica a través de amplificación puente generando agrupamientos. Cuando la generación de agrupamientos se completa, el molde está listo para la secuenciación.
- 3- *Secuenciación*: la tecnología de *Illumina* utiliza un método basado en terminación reversible que detecta unas simples bases cuando son incorporadas a la hebra molde de ADN.
- 4- *Análisis de datos*: Se realiza empleando diferentes programas bioinformáticos como Mothur o QIIME entre otros.

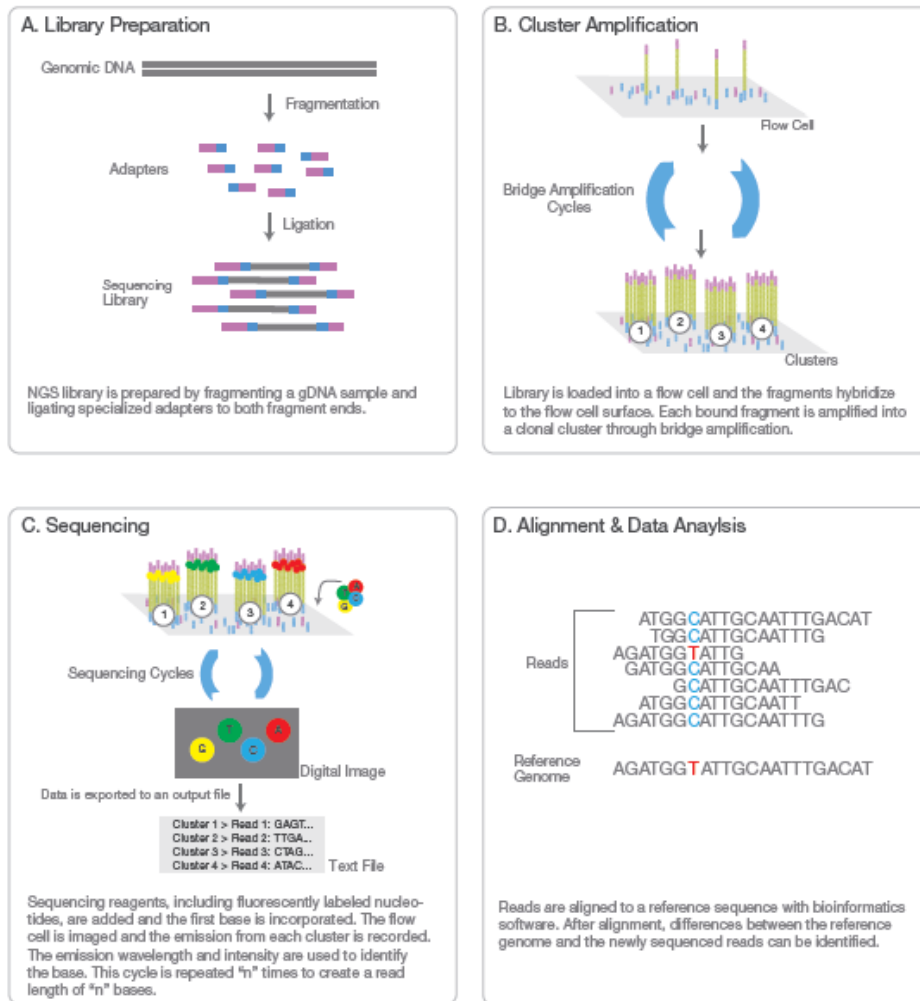


Figura 1. Descripción detallada del proceso de secuenciación masiva, Illumina. Tomado de www.Illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html.

El principal avance en esta tecnología se vincula con el desarrollo de la secuenciación de *paired-end* (PE). Este mecanismo implica la secuenciación de ambos extremos de los fragmentos de ADN en una librería de secuenciación y la alineación de las lecturas de avance y retroceso obtenidas, formando pares de lecturas (Figura 2).

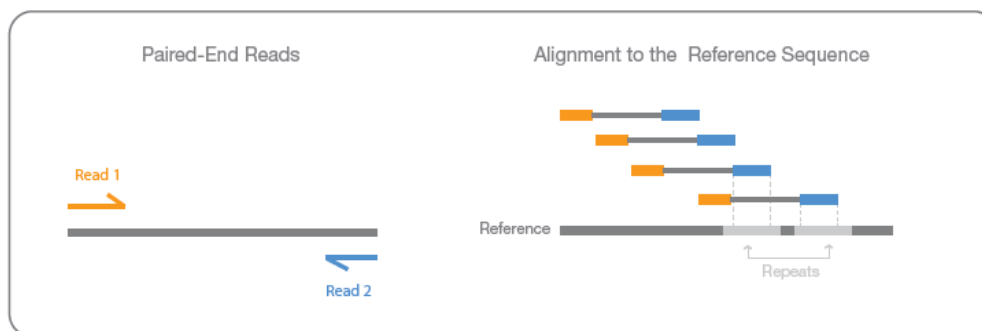


Figura 2. Secuenciación *paired-end* y alineamiento. La secuenciación *paired-end* permite la secuenciación por ambos extremos de un fragmento de ADN. Tomado de www.Illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html.

El ADN obtenido se analizó mediante secuenciación masiva en la plataforma Illumina MiSeq *paired-end* (PE) durante 250 ciclos; con *primers* y *barcodes* para la región V4 del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Esto se realizó en el Servicio de Secuenciación y Análisis de la Universidad de Texas, Austin, Estados Unidos (<https://wikis.utexas.edu/display/GSAF/Home+Page>)

Los *reads* (lecturas) *paired-end* se fusionaron y se procesaron utilizando paquetes de software de QIIME (Qiime.org) (Caporaso *et al.*, 2010). Las secuencias se analizaron mediante herramientas de dicho software con los parámetros por defecto que se usan en cada paso. Se filtraron las secuencias en base a su calidad (*score* de calidad Q25). Las quimeras se detectaron y filtraron mediante el programa USEARCH 6.1. La adjudicación de las Unidades Operacionales Taxonómicas *de novo* (OTUs) se realizó con la opción *uclust* (Edgar, 2010). Posteriormente se normalizó el número de secuencias obtenidas en todas las muestras al menor número obtenido con el fin de asignar taxonómicamente las OTUs representativas, mediante la base de datos *Greengenes* (Lan *et al.*, 2012) con un 97% de identidad de las secuencias y realizar análisis comparativos. Las secuencias que se identificaron como secuencias mitocondriales o de cloroplastos, se filtraron de la matriz de datos.

La profundidad de muestreo óptimo se determinó a través de las curvas de rarefacción de OTUs observadas versus la profundidad de muestreo, para el caso de las muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras. Posteriormente se determinó el índice de diversidad alfa (Shannon), para cada grupo.

En el caso de las muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras, se generaron matrices de distancias para comparar las abundancias relativas de OTUs utilizando el método Unifrac weighted. Finalmente se analizó la diversidad beta mediante un análisis de coordenadas principales.

3.1.6. Análisis estadístico

En primer lugar se evaluó si los datos se ajustaban a los supuestos paramétricos (Normalidad mediante el Test de Kolmogorov Smirnov y homogeneidad de varianza utilizando el test de Levene). En los casos en que los datos se ajustaron a supuestos paramétricos, se evaluaron diferencias entre grupos empleando el test t Student, o test de ANOVA según corresponda. En los casos en que no se cumplieron los supuestos para el uso de estadística paramétrica, las diferencias entre grupos se analizaron mediante los test de Mann Whitney y Kruskal-Wallis, según correspondiera. En todos los casos, valores de p por debajo de 0.05 fueron considerados significativos. Para los análisis multivariados, se realizaron análisis de PERMANOVAS. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Past 3x versión 2.17c (Hammer *et al.*, 2001) y en QIIME.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Puesta a punto de PCR- DGGE

En una primera etapa se empleó ADN bacteriano intestinal obtenido de cinco abejas individuales de la misma colmena, se amplificó la región V6-V8 del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal mediante PCR y se analizó mediante DGGE empleando diferentes gradientes de desnaturalización de urea-formamida. El gradiente 45-70% permitió la obtención de un perfil claro de bandas.

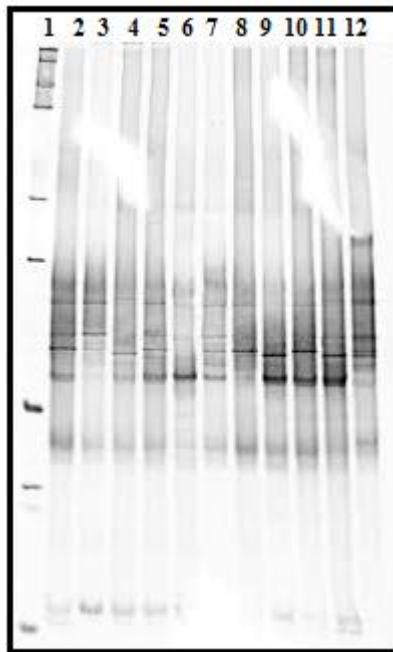


Figura 3. Análisis de la comunidad microbiana intestinal de abejas nodrizas mediante DGGE, utilizando un gradiente de desnaturalización de 45-70. Carriles 1: Marcador de peso molecular un kb plus (Fermentas). 2-11: ADN bacteriano de homogeneizados intestinales individuales de abejas nodrizas. 12: ADN bacteriano de homogeneizados intestinales de un *pool* de 20 abejas nodrizas.

Una vez que se determinó el gradiente a utilizar, se evaluó la variabilidad de los patrones obtenidos para 10 abejas individuales, así como el patrón obtenido de un *pool* de 20 abejas pertenecientes a la misma colmena (Figura 3). Se encontraron variaciones entre los diferentes patrones obtenidos a nivel individual indicando que la comunidad bacteriana variaba en cada individuo a pesar de pertenecer a la misma colmena (4-11 bandas). La diversidad encontrada en el patrón obtenido del *pool* de los 20 individuos

fue mayor que la encontrada en los patrones de cada individuo, por lo que se resolvió emplear *pooles* de 20 individuos en los siguientes análisis (Figura 4).

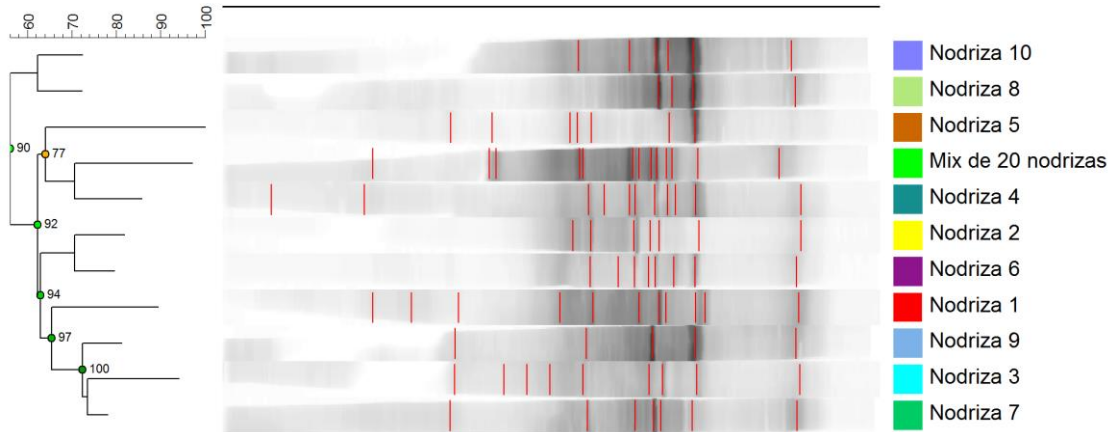


Figura 4. Cladograma que muestra la relación entre la comunidad bacteriana intestinal de abejas nodrizas individuales (nodrizas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) y del mix de las 20 nodrizas, analizado mediante PCR-DGGE (Método de agrupamiento: Neighbour Joining, Coeficiente de similitud: DICE, Optimización: 0,4% y Tolerancia: 0,8%).

3.2.2. Análisis de la comunidad bacteriana durante el desarrollo

Luego de la puesta a punto de la técnica de DGGE, se prosiguió con el análisis de las muestras de *pooles* de los individuos en los diferentes estadios de desarrollo. Se lograron obtener patrones complejos de entre nueve y 20 bandas. Los estadios más tempranos del desarrollo (huevos, larvas y pupas) presentaron patrones de bandas similares entre sí sugiriendo una semejanza en la estructura de su comunidad microbiana independientemente de la colmena seleccionada (Figura 5). Por otro lado, las muestras de las abejas nodrizas y pecoreadoras presentaron patrones de bandas similares, diferenciándose de las muestras de los estadios más tempranos.

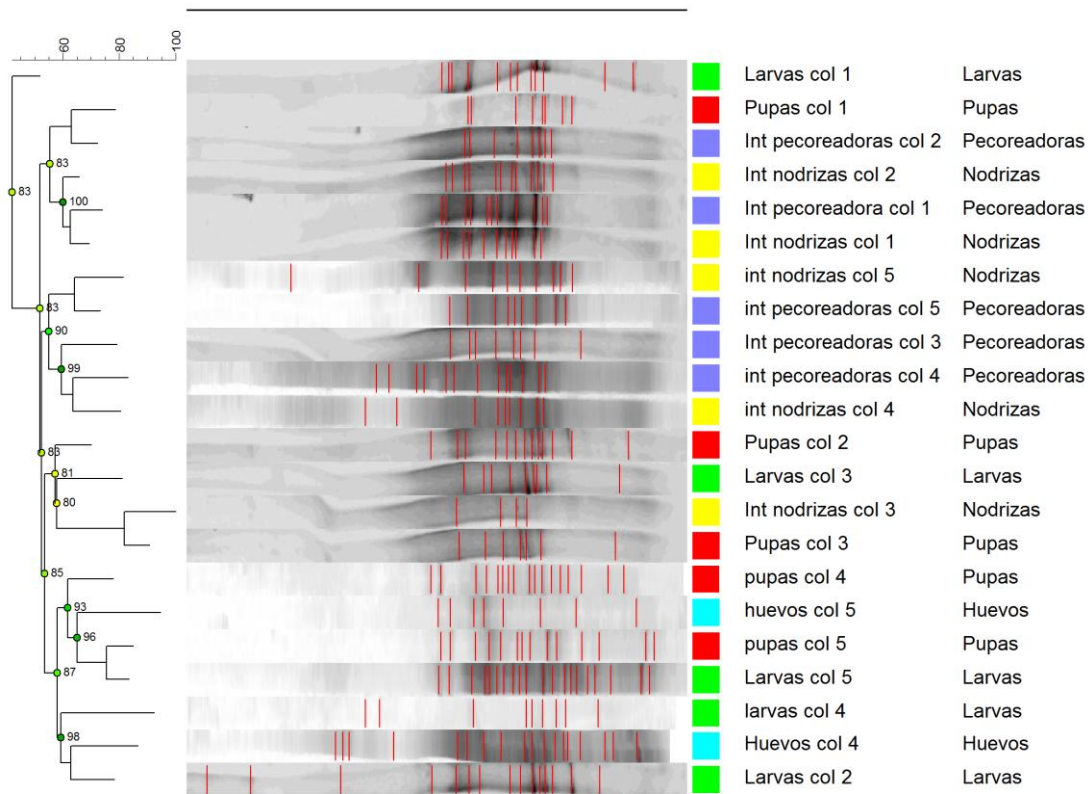


Figura 5. Cladograma que muestra la relación entre la comunidad bacteriana de las abejas melíferas en el transcurso de su desarrollo, desde huevos, larvas, pupas, abejas nodrizas y abejas pecoreadoras de cinco colmenas, analizado mediante PCR-DGGE (col 1, 2, 3, 4 y 5) (Método de agrupamiento: Neighbour Joining, Coeficiente de similitud: DICE, Tolerancia: 1,0 %).

Dada la elevada variación en el número de *reads* obtenido en las diferentes muestras, variando de 595 (larvas) a 19512 (abejas adultas), se decidió no realizar la estandarización de los números de *reads* al menor número en el conjunto de las muestras de los diferentes estadios. Se analizó cada etapa del desarrollo de forma independiente (Figura 6 y 7, Tabla 1), excepto para las muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras. Estas últimas muestras se estandarizaron a 19512 *reads*. La gran variabilidad de *reads* obtenidos en las diferentes muestras de los estadios tempranos es un indicio de que muchos de esos microorganismos podrían pertenecer al ambiente de la colmena. Esto se observó especialmente en el caso de huevos, donde de las tres muestras colectadas solo en dos se logró obtener ADN, y solo en una de las dos muestras se logró tener *reads* que pudieron ser identificados, en un total de 126.085.

Analizando solo las muestras correspondientes a las abejas nodrizas (1, 2, 3) y pecoreadoras (1, 2, 3), se identificaron un total de 79 OTUs normalizados.

En todas las muestras analizadas (huevos, larvas, pupas, abejas nodrizas y pecoreadoras) se detectaron los *phyla* Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacterias; con la excepción del *phylum* Bacteroidetes el cual sólo se encontró en las muestras correspondiente a los estadios de desarrollo tempranos (huevos, larvas y pupas) (Figura 7). En todos los casos el *phylum* más abundante fue Proteobacteria (Huevos: 96%, Larvas: 95%, Pupas: 56%, Nodrizas: 55,5% y Pecoreadoras: 72,8%).

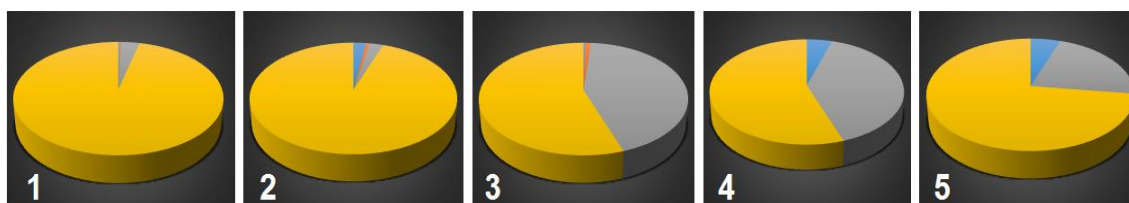


Figura 6. Abundancias relativas de los *phyla* identificadas para los diferentes estadios del desarrollo de las abejas (1 Huevo; 2. Larvas; 3. Pupas; 4. Nodrizas; 5. Pecoreadoras). Las diferentes muestras corresponden a pools de 20 individuos. Estos valores representan promedios de tres réplicas de *pools*, excepto para el *pool* de huevos donde solo se presentan de un único *pool*. El color naranja representa al *phyla* Proteobacterias, el color naranja fuerte a Bacteroidetes, el gris a Firmicutes y el celeste a Actinobacterias.

Tabla 1. Abundancias relativas de *phyla* bacterianos presentes en huevos, larvas, pupas, abejas nodrizas y pecoreadoras, y sus correspondientes *reads* por estadios.

Leyenda		<i>Phyla</i>	Abundancia relativa				
			Huevos	Larvas	Pupas	Nodrizas	Pecoreadoras
		Actinobacteria	0,3	2,3	0,3	4,7	5,4
		Bacteroidetes	0,2	0,7	1,3	-	-
		Firmicutes	3,3	2,5	51,1	39,8	21,8
		Proteobacteria	96,2	96,3	65,3	55,5	72,8
Reads post-control	calidad		126085	595	1609	19400	19400

Al analizar la composición a nivel de familias o géneros, se observa que en los estadios tempranos hay gran variabilidad en su composición, mientras que la comunidad en las etapas de individuos adultos se vuelve más estable (Figura 7, Tabla 2). Las familias bacterianas presentes en las abejas adultas fueron Pasteurellaceae, Bartonellaceae, Lactobacillaceae, Acetobacteraceae, Pseudomonadaceae, Bifidobacteriaceae y Neisseriaceae. No se observaron diferencias significativas en las abundancias de estas familias entre las abejas nodrizas y las abejas pecoreadoras (test de t, $p > 0,05$ en todos los casos). Una observación a resaltar es que el género *Bifidobacterium* aparece únicamente en las abejas adultas, mientras que los restantes generos que están presentes en las abejas adultas están presentes en algunos de los otros estadios.

Los resultados obtenidos mediante DGGE así como por secuenciación masiva indican que la estructura y la composición de la comunidad microbiana cambian durante el transcurso del desarrollo de la abeja, volviéndose más estable en el individuo adulto.

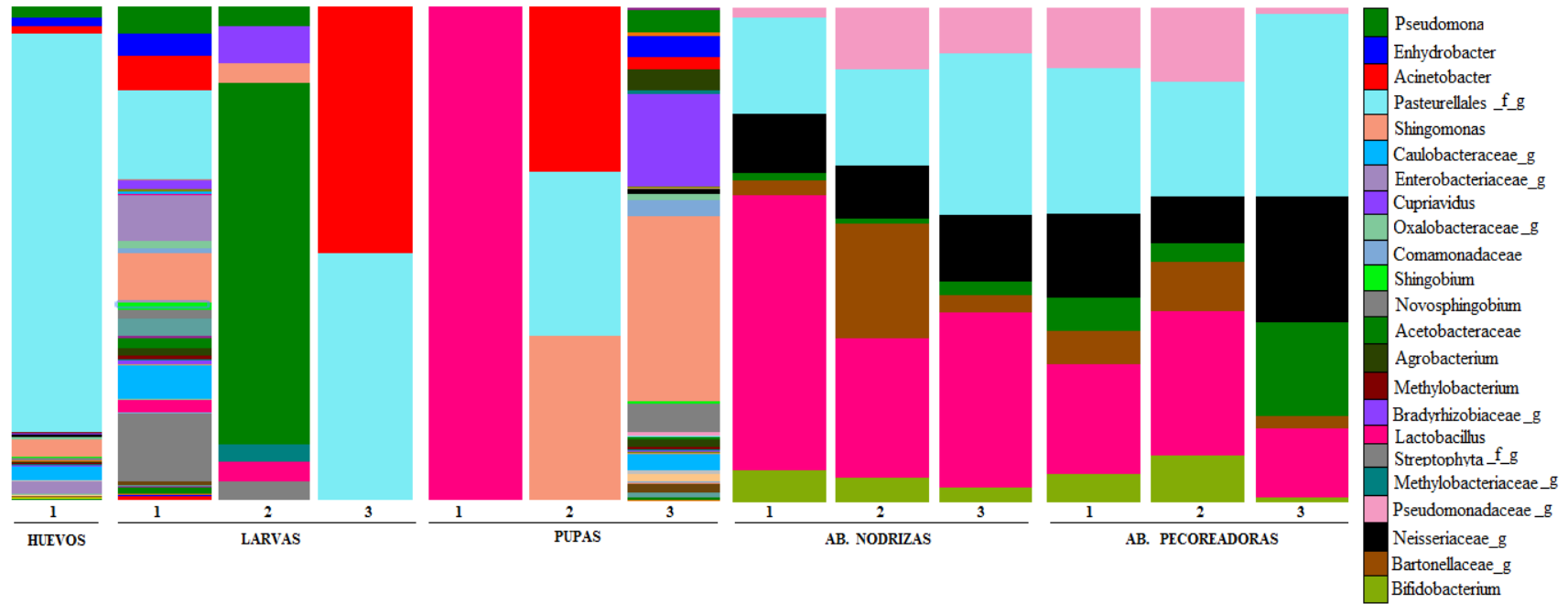


Figura 7. Abundancias relativas de OTUs correspondientes a géneros y especies bacterianas pertenecientes a la comunidad microbiana intestinal en los diferentes estadios obtenidos de 3 colmenas diferentes (col 1, col 2 y col 3).

Tabla 2. Abundancias relativas de las distintas OTUs bacterianas pertenecientes a las comunidades bacterianas intestinal de los diferentes tratamientos de abejas.

Orden	Familia	Género/Especie	Huevos			Larvas			Pupas			Ab. Nodrizas			Ab. Pecoreadoras		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	2,1	5,5	3,8	0	0	0	4,3	0	0	0	0	0	0		
Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Enhydrobacter</i>	1,6	4,2	0	0	0	0	4,1	0	0	0	0	0	0		
Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	1,6	7,1	0	50,0	0	33,3	2,8	0	0	0	0	0	0		
Pasteurellales	-	<i>Gilliamella apícola/ Frischella perrara</i>	80,9	17,9	0	50,0	0	4,0	33,3	19,4	19,2	32,9	29,6	23,3	36,8		
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	3,3	10,1	3,8	0	0	33,3	37,6	0	0	0	0	0	0		
Caulobacterales	Caulobacteraceae	-	2,5	6,8	0	0	0	0	3,5	0	0	0	0	0	0		
Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	0,3	2,4	3,8	0	100	0	1,4	55,8	23,5	35,6	22,4	29,4	13,6		
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-	0,2	1,8	7,7	0	0	0	18,9	0	0	0	0	0	0		
Burkholderiales	Oxalobacteriaceae	<i>Cupriavidus</i>	0,1	9,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Burkholderiales	Oxalobacteriaceae	-	0,4	1,6	0	0	0	0	0,9	0	0	0	0	0	0		
Burkholderiales	Comamonadaceae	-	0	0,9	0	0	0	0	3,5	0	0	0	0	0	0		
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i>	0,3	1,4	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0		
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i>	0,4	2,0	0	0	0	0	5,8	0	0	0	0	0	0		
Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Parasaccaribacter apis</i>	0,1	1,9	73,1	0	0	0	0,4	1,6	0,8	2,7	6,9	3,5	19,0		
Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	0,4	1,2	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0	0	0		
Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	0,3	0,8	0	0	0	0	0,7	0	0	0	0	0	0		
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	-	0	0	0	0	0	0	0	1,8	12,5	9,1	12,2	14,8	1,1		
Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Snodgrassella alvis</i>	0	0	0	0	0	0	0	12,1	11,0	13,3	16,8	9,7	25,7		
Rhizobiales	Bartonellaceae	<i>Bartonella apis</i>	0	0	0	0	0	0	0	2,8	23,5	3,6	6,5	9,9	2,7		
Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	6,4	5,0	2,8	5,6	9,4	1,1		

3.2.3. Análisis de la comunidad microbiana a lo largo de un año

Se estudió la variación de la comunidad bacteriana de las abejas melíferas nodrizas durante un año, con el fin de evaluar la incidencia de las variaciones estacionales (y con esto la variación en la oferta floral disponible) en dicha comunidad.

En primer lugar, la variación en esta comunidad se analizó mediante PCR-DGGE. Para una clara interpretación de los resultados, las muestras se agruparon por color de acuerdo a las estaciones del año donde fueron colectadas. Se pueden observar cuatro grandes grupos A, B, C y D (Figura 8). Las muestras agrupadas en A corresponden a las muestras colectadas en los meses de INVIERNO, las muestras en B corresponden a las muestras colectadas en VERANO-OTOÑO, las de C en PRIMAVERA-VERANO y las muestras en el grupo D corresponden a las obtenidas en los meses de INVIERNO-PRIMAVERA.

Se observa que la estructura de la comunidad bacteriana intestinal de las abejas varía gradualmente a lo largo el año. Las muestras de abejas colectadas en invierno se agruparon en un clado separadas del resto de las muestras analizadas.

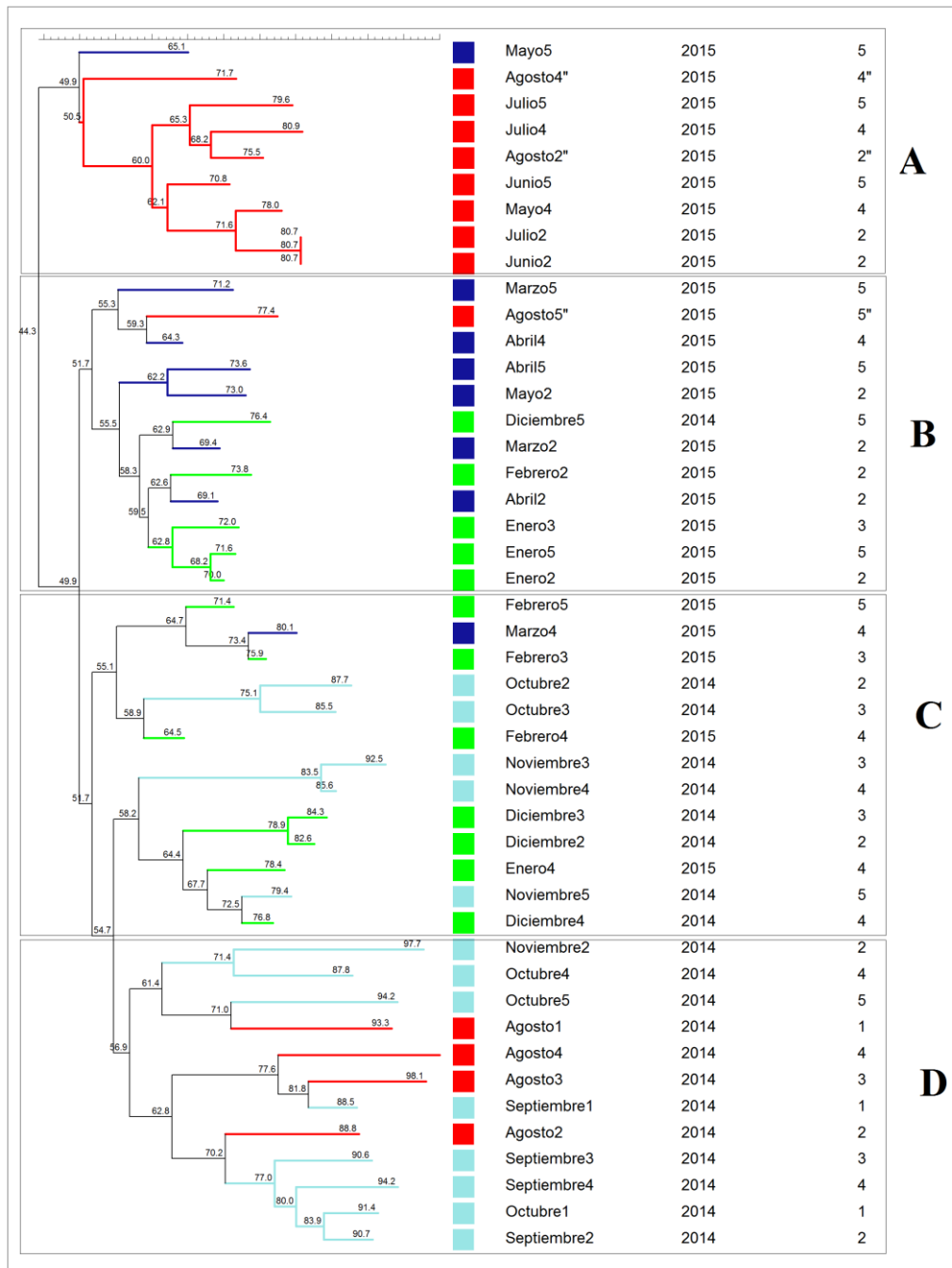


Figura 8. Cladograma del análisis de la variación de la comunidad microbiana de las abejas melíferas a lo largo de un año, desde el mes de setiembre de 2014 al mes de agosto de 2015 (col 1, 2, 3, 4 y 5). Los meses de color **Verde** corresponden a la estación VERANO, los asignados con color **Azul oscuro** corresponden OTOÑO, el color **Rojo** corresponde a INVIERNO y el color **Celeste** se corresponde con los meses de PRIMAVERA. (Método de agrupamiento: Neighbour Joining, Coeficiente de similitud: DICE, Optimización: 0,5% y Tolerancia: 0,6%).

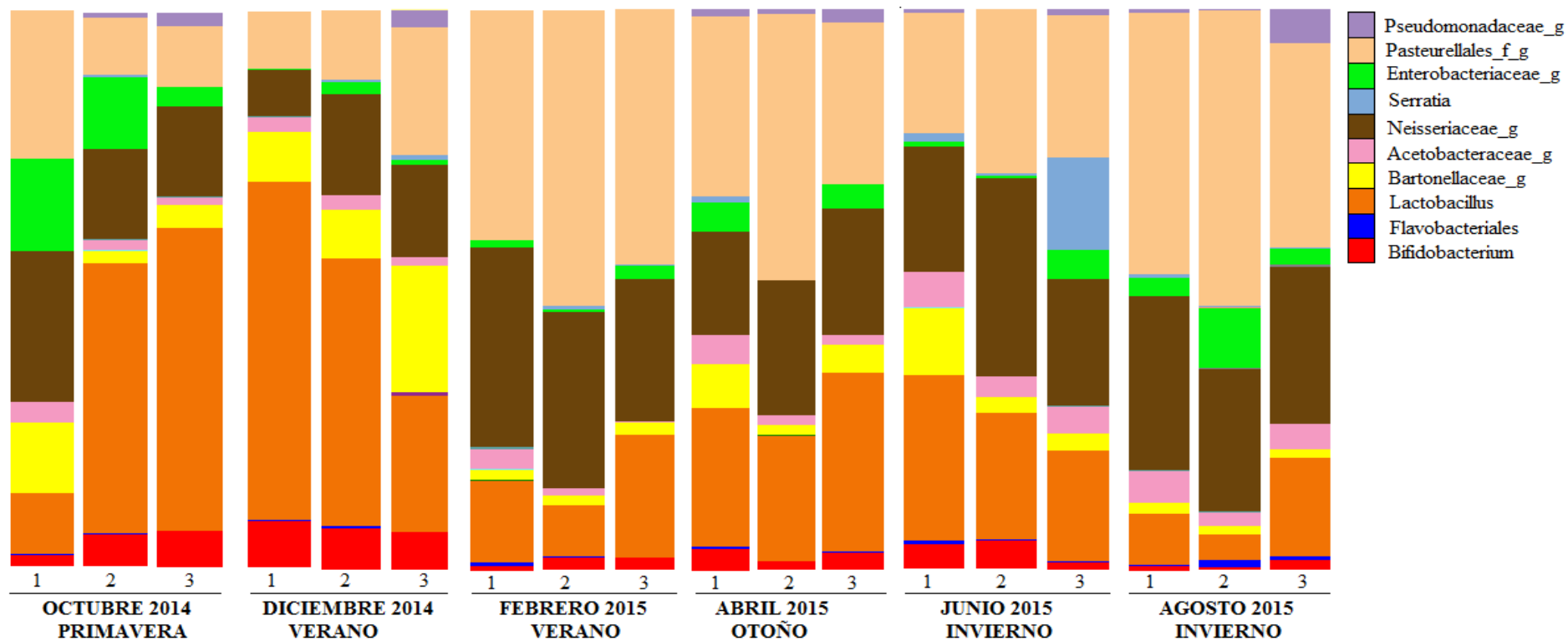


Figura 9. Géneros bacterianos identificados en la comunidad microbiana intestinal de abejas nodrizas colectadas en octubre 2014, diciembre 2014, febrero 2015, abril 2015, junio 2015 y agosto 2015.

Tabla 3. Abundancias relativas de las OTUs bacterianas de la comunidad bacteriana intestinal de las muestras de abejas nodrizas colectadas durante 2014-2015, 1, 2 y 3 corresponden a 3 colmenas diferentes, La numeración de cada colmena se mantuvo a lo largo del ensayo.

Orden	Familia	Género	OCTUBRE 2014- PRIMAVERA			DICIEMBRE 2014- VERANO			FEBRERO 2015- VERANO			ABRIL 2015- OTOÑO			JUNIO 2015- INVIERNO			AGOSTO 2015- INVIERNO		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	-	0	0,7	2	0	0	2,8	0	0,1	0	1,3	0,7	2,3	0,5	0	1	0,5	6	0,2
Pasteurellales	-	<i>Gilliamella apicola</i> , <i>Frischella perrara</i>	10,1	10,6	11,2	26,6	12,2	22,7	40,7	52,5	45,4	32,1	47,6	28,7	22	29,1	25,3	46,8	36,4	52,8
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	0	0	0	0	0,5	1	0	0,7	0,4	1	0	0,1	1,2	0,4	16,4	0,6	0,2	0,3
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-	0,3	13,2	3,8	16,7	2,2	0,7	1,3	0,5	2,3	5	0,2	4,4	0,8	0,5	5,1	2,8	3	10,5
Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Snodgrassella</i>	8,4	16,3	16	26,9	18,2	16,6	35,7	31,6	25,3	18,2	24	22,5	22,3	35,3	22,6	31,6	28,1	25,3
Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Parasaccaribacter apis</i>	2,3	1,7	1,3	3,9	2,3	1,5	3,7	1,1	0,2	5,5	1,6	1,8	6,4	3,7	4,4	5	4,3	2,5
Rhizobiales	Bartonellaceae	<i>Bartonella apis</i>	9,2	2,4	4,1	12,3	9	22,5	1,7	1,8	2,2	7,8	2	4,7	12,1	2,9	3,2	2,2	1,3	1,7
Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	61	48,6	54,5	10,9	47,9	24,5	14,3	9,1	22	24,5	22,2	31,9	29,6	22,6	19,7	9,1	17,6	4,4
Flavobacteriales	-	-	0,20	0,50	0,1	0,5	0,1	0	0,5	0,2	0	0,4	0,1	0,2	0,5	0,2	0,4	0,2	0,7	1,2
Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	8,3	5,6	6,5	2	7,6	6,7	1	2,4	2	3,9	1,5	3,1	4,5	5,1	1,5	1,1	1,9	0,6
Indice de Shannon			3,44	3,60	3,76	3,48	3,40	3,39	2,88	2,52	2,77	3,71	2,94	3,35	3,45	2,98	3,62	3,00	3,24	2,84

Respecto al análisis de la comunidad microbiana intestinal mediante secuenciación masiva, se analizaron un total de 201.604 *reads*, de los cuales 201.529 pasaron los controles de calidad de las mismas. A partir de las 201.529 secuencias, para el análisis taxonómico y poder realizar comparaciones entre las muestras, las secuencias se normalizaron a 6914 *reads* por muestras. Posteriormente se eliminaron las secuencias raras (*singletons*) y únicas por lo que la matriz de datos se formó por 51 OTUs.

En todas las muestras colectadas se observaron los mismos géneros bacterianos, los que se mantuvieron presentes durante todo el año. Esta composición bacteriana estable confirma la presencia de un núcleo bacteriano formado por *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Gilliamella* y *Snodgrassella*. Junto con las especies *Bartonella apis*, *Frischella perrara* y *Parasaccharibacter apium* forman el grupo dominante (Figura 9, Tabla 3). Sin embargo, las abundancias de los microorganismos que forman parte del núcleo variaron significativamente en las diferentes estaciones (PERMANOVA 1000 permutaciones, $p=0,003$) (Figura 10). Particularmente los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentaron una mayor abundancia en primavera (octubre 2014) con respecto a las muestras analizadas en invierno (Agosto 2015), (ANOVA, $F=8,144$, $p=0,0015$; y $F=4,768$, $p=0,0124$, respectivamente).

La diversidad presente en las muestras, estimada a través del índice de Shannon, también varió durante el año disminuyendo en verano (febrero 2015) ($2,72 \pm 0,10$) y aumentando en primavera (Octubre y Diciembre 2014) ($3,6 \pm 0,09$; $3,4 \pm 0,03$ respectivamente), posiblemente debido a las diferencias en las abundancias de los diferentes grupos bacterianos que forman parte de esta comunidad.

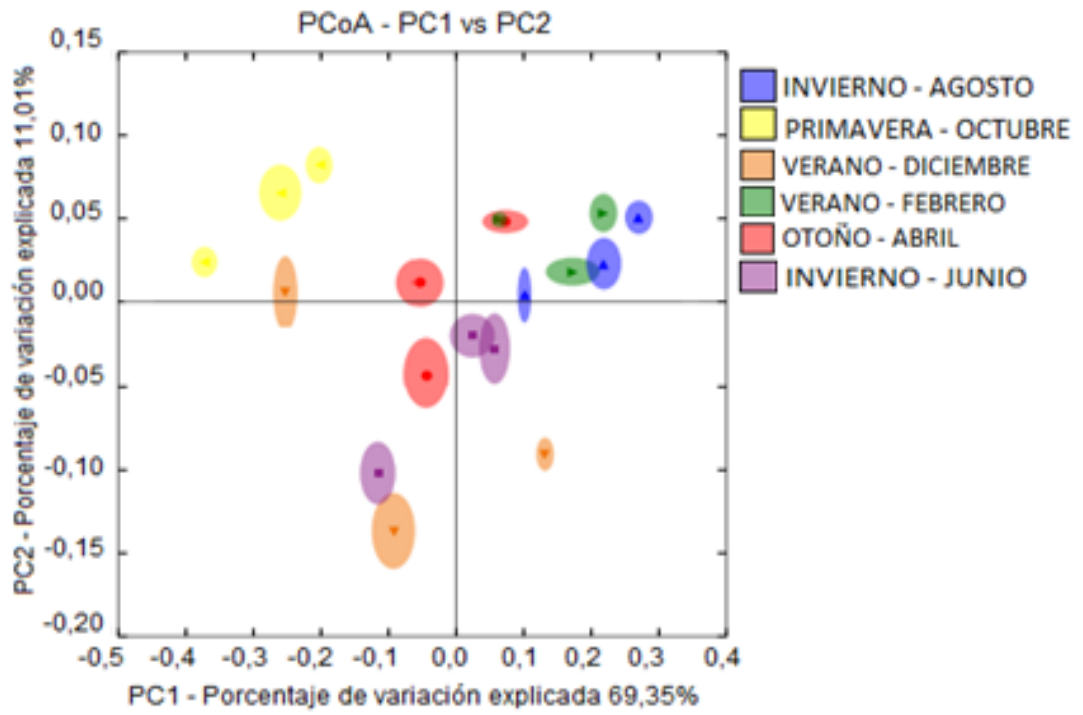


Figura 10. Análisis de coordenadas principales β diversidad – Unifrac.

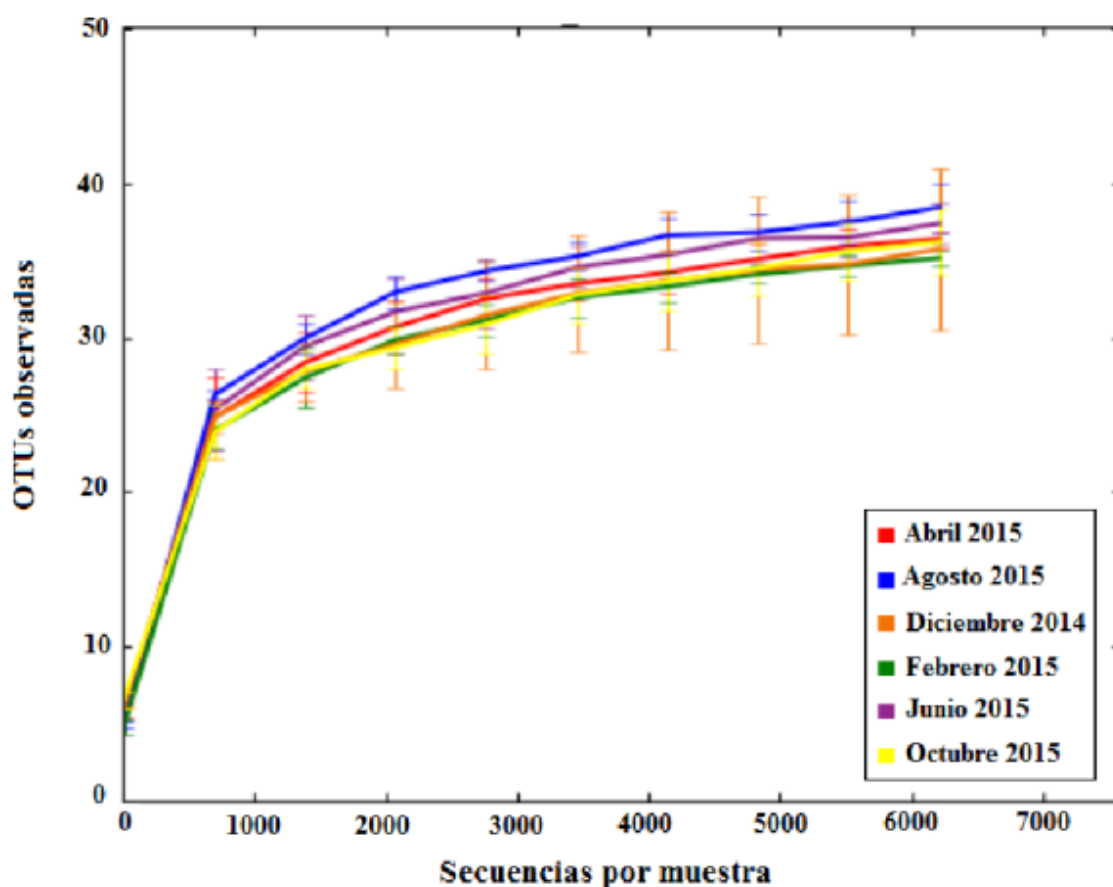


Figura 11. Curvas de rarefacción de OTUs observadas por muestra analizada.

Las curvas de rarefacción indican cómo varía la diversidad de las muestras analizadas con respecto al número de secuencias o lecturas obtenidas por muestra. En este caso, se puede observar que el número de OTUs observadas en las diferentes muestras es similar, alcanzándose en todos los casos la etapa estacionaria en la gráfica. Esto indica que aunque se aumente el esfuerzo de muestreo, la diversidad obtenida en OTUs sería la misma (Figura 11).

3.3. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los estadios tempranos de desarrollo de la abeja (huevos, larvas y pupas) presentan una comunidad microbiana variable a lo largo del desarrollo. Esto concuerda con lo reportado por Martinson *et al.*, (2012) quienes determinaron que las abundancias y la estructura de comunidad microbiana en *Apis mellifera* es variable en su ciclo vital. Esta variación podría representar la diversidad de microorganismos que entran en contacto con estos individuos a través de su alimento (pan de polen) y el ambiente que las rodea. Sin embargo, si bien se logró extraer y analizar el ADN bacteriano presente en los estadios iniciales de desarrollo (huevos, larvas y pupas), el número de *reads* fue muy variable. El alto número de *reads* obtenidos a partir de muestras de huevos es llamativo, y podría deberse a la falta de esterilización superficial de estos individuos. En este caso se podría estar analizando los microorganismos pertenecientes a la celda de cría y/o al ambiente que rodea al huevo, y no directamente a su interior.

Otro de los factores que pueden influir en la diversidad encontrada en los primeros estadios de desarrollo es la alimentación. En muchos insectos sociales, las larvas ingieren alimentos procesados por las abejas adultas, alimento que podría ser alterado para inhibir el crecimiento microbiano o enriquecer un cierto subconjunto de los microorganismos no patógenos (Cremer *et al.*, 2007; Cremer and Sixt, 2009). Aizenberg-Gershtein *et al.*, (2013), proponen que las bacterias presentes en la superficie de las abejas (incluyendo la probóscide), tienen su origen en el néctar de las plantas, y las abejas actúan como vector al inocular a las larvas con esta comunidad microbiana.

En el caso de las abejas adultas (tanto nodrizas como pecoreadoras) a diferencia de lo obtenido en los individuos de estadios tempranos, la comunidad microbiana es estable, coincidiendo con lo reportado previamente (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Babendreier *et al.*, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011; Mohr and Tebbe, 2006; Mohr and Tebbe, 2007; Olofsson and Vásquez, 2008). Los géneros principalmente detectados fueron *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Bartonella*, *Lactobacillus*. y *Bifidobacterium*., coincidiendo con los grupos descritos previamente para estos individuos (Kesnerova *et al.*, 2016; Corby-Harris *et al.*, 2014; Martinson *et al.*, 2011; Engel *et al.*, 2013). Existen evidencias que permiten asumir que *Gilliamella* spp. y *Snodgrassella* spp. son simbiontes mutualistas, con roles importantes en la defensa

contra patógenos así como en la nutrición (Koch and Schmid-Hempel, 2011; Engel *et al.*, 2012). Por otro lado, diferentes estudios han mostrado que *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. también pueden tener un rol importante en la defensa contra patógenos, posiblemente a través de la producción de sustancias antimicrobianas (Killer *et al.*, 2014; Butler *et al.*, 2013; Forsgren *et al.*, 2009; Vásquez *et al.*, 2012). Aunque otras especies bacterianas puedan estar presentes ocasionalmente, la comunidad microbiana intestinal de las abejas está formado por este núcleo de microorganismos, que están adaptados al nicho intestinal (Kwong y Moran, 2016).

En cuanto a la variación estacional de la comunidad bacteriana intestinal de las abejas, se confirmó la presencia de este núcleo bacteriano estable y adaptado. Las variaciones en las abundancias relativas de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. principalmente, sugieren que estos géneros no solo se pueden compartir o transferir horizontalmente mediante la trofolaxia entre las nodrizas sino que también pueden ser incorporados desde el exterior mediante su alimento. Estos grupos taxonómicos incrementan significativamente su presencia en primavera, cuando los cultivos comienzan a florecer y por lo tanto la colmena recibe un fuerte pico de entrada tanto de néctar como de polen. El pan de polen también posee una comunidad microbiana asociada, estando generalmente los lactobacilos y las bifidobacterias entre los principales componentes de la comunidad bacteriana (Vásquez y Olofsson, 2015). Vásquez y Olofsson, (2009) especulan que estos géneros bacterianos son claves en los procesos de fermentación presentes en la formación y almacenamiento del pan de polen.

Esto nos permite confirmar nuestra hipótesis de trabajo, que establece que la comunidad microbiana en *Apis mellifera* varía durante el desarrollo del individuo, estabilizándose en la etapa de adulto del insecto. A pesar de que esta comunidad microbiana es estable, la misma puede tener variaciones estacionales posiblemente asociada a las variaciones de fuentes de polen.

4. CAPÍTULO 2: INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN EN LA COMUNIDAD MICROBIANA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS, EN SU SISTEMA INMUNE Y EN LA SUSCEPTIBILIDAD A PATÓGENOS

Una vez que se conoce por medio de los resultados del capítulo anterior, como esta compuesta y como varía la microbiota intestinal de *Apis mellifera*, proseguimos con el análisis del efecto que generan diferentes factores que afectan a estos insectos sobre la comunidad microbiana intestinal. Para esto, se planteó como objetivos de este capítulo analizar si la dieta (monofloral (*E. grandis*) vs. polifloral) es capaz de alterar la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas así como el sistema inmune, y afectar el desarrollo de los patógenos (*N. ceranae*). En este capítulo se emplearán crías de abejas en laboratorio, para el análisis de la comunidad microbiana se utilizarán las mismas técnicas moleculares (DGGE y Secuenciación masiva). Para evaluar la expresión de diferentes genes inmunológicos de las abejas se empleará la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), y por último para evaluar el desarrollo del microsporidio *N. ceranae* se realizarán recuentos de esporas en microscopio óptico.

Los resultados obtenidos nos permitirán plantearnos un modelo con el fin de buscar nuevas estrategias naturales para combatir los patógenos apícolas.

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Diseño experimental I: Efecto de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en su sistema inmune

Para la realización de los experimentos planteados en este capítulo se empleó un modelo de cría e infección de abejas en laboratorio. Se tomaron cuadros con cría a punto de emerger de colmenas saludables de híbridos locales (*A. m. scutellata*, *A. m. lingustica* y *A. m. mellifera*) pertenecientes a un apiario experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA “La Estanzuela”) Colonia, Uruguay. Las colonias fueron tratadas contra *Varroa destructor* en agosto (Amitraz) y el experimento se llevó a cabo durante la primavera. Se obtuvieron seis cuadros de abejas a punto de emerger, se trasladaron al laboratorio y se colocaron en una incubadora a $34 \pm 1^\circ\text{C}$ y a una humedad relativa del 60%. A medida que las abejas iban emergiendo se colocaron

cuidadosamente en grupos de 40 en cajas especialmente diseñadas con este fin (dimensiones 11,5 × 11,5 × 15,0 cm). Se prepararon 12 cajas con 40 abejas cada una, y se las sometió a dos regímenes nutricionales diferentes. Seis cajas se alimentaron con pan de polen monofloral (proveniente de colmenas ubicadas en plantaciones de *E. grandis*), mientras que las otras seis cajas recibieron pan de polen polifloral (manualmente preparado a partir de pan de polen de diferentes colmenas). Además, todas las abejas se alimentaron *ad libitum* con una solución de sacarosa (50% p/p en agua). Las abejas fueron chequeadas, alimentadas y contadas diariamente. Los individuos muertos fueron removidos. A los 7 y 10 días post emergencia (p.e), se colectaron 20 abejas de cada caja de tres cajas por tratamiento para el análisis de la comunidad microbiana intestinal. En paralelo, a los 10 días p. e. se colectaron diez abejas por tratamiento y se mantuvieron a -80°C para analizar su respuesta inmune (Figura 12).

1- Polifloral (PF):



40

40

40

2- E. grandis (Eg):



40

40

40

Estructura y diversidad bacteriana

7 y 10 días post emergencia

Illumina MiSeq

Expresión de genes vinculados a la inmunidad

10 días post emergencia

PCR en tiempo real

Figura 12. Representación esquemática del diseño experimental I.

4.1.2. *Diseño experimental II: Rol de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en la susceptibilidad a patógenos*

Este ensayo fue una modificación del ensayo anterior, y se realizó en colmenas de un apiario experimental (J. J. Nágera) ubicado en Mar del Plata, Argentina, en el marco de una pasantía realizada en el Centro de investigación en abejas sociales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata. En este ensayo se incorporó la infección de las abejas con el microsporidio *N. ceranae*.

Las esporas de *N. ceranae* se obtuvieron a partir de colonias naturalmente infectadas. Se aislaron diez ventrículos (sin ampolla) de un *pool* de abejas pecoreadoras retornantes de vuelo y se homogeneizaron en 2 µl de agua destilada utilizando un mortero. Los homogeneizados se filtraron con malla de acero de tamaño 0,5 mm. El filtrado se suplementó con 10 ml de agua destilada. El filtrado resultante se centrifugó a 600g durante 5 min para recuperar un *pellet* más limpio. Dicho *pellet* se resuspendió en un volumen final de 10 ml de agua destilada (Di Pasquale *et al.*, 2013). El número de esporas se determinó utilizando un hemocitómetro bajo un microscopio de luz.

Las abejas recién emergidas se colocaron en grupos de 80, en cajas especialmente diseñadas con este fin (dimensiones 11 × 6 × 9 cm). Se prepararon 12 cajas con 80 abejas cada una, y se las sometió a dos regímenes nutricionales diferentes. Seis cajas se alimentaron con pan de polen monofloral (*E. grandis*), mientras que las otras seis cajas recibieron pan de polen polifloral. Además, todas las abejas se alimentaron *ad libitum* con una solución de sacarosa (50% p/p en agua). Las abejas se mantuvieron en incubadora, y diariamente se monitorearon. A los tres días post emergencia, se retiraron los alimentos de cada caja con el fin de mantener a las abejas en un periodo de cinco horas de hambruna. Posteriormente, las abejas de tres cajas de cada régimen nutricional se infectaron de forma individual con 10 µl de solución de jarabe 2:1 (1 kg agua/ 2kg azúcar) contaminada con 100.000 esporas de *Nosema* spp. (Porrini *et al.*, 2013). La solución fue constantemente agitada, asegurando una suspensión uniforme. Las restantes tres cajas de cada régimen constituyeron los grupos controles, a las cuales se les administró el mismo volumen de jarabe 2:1 sin esporas de *Nosema* spp.

Las abejas se chequearon, alimentaron y contaron diariamente. Los individuos muertos se removieron.

A los siete y diez días post emergencia (p.e), se colectaron 20 abejas de cada caja, de tres cajas por tratamiento para el análisis de la comunidad microbiana intestinal. En paralelo, a los cuatro, diez y 12 días post infección se extrajeron tres abejas por tratamientos para determinar el número de esporas de *Nosema* spp. por abeja, con el fin de evaluar el desarrollo del microsporidio. Se extrajeron los intestinos de forma individual pellizcando los últimos segmentos abdominales y se cortó el intestino medio. Los intestinos se almacenaron a -20 °C hasta la cuantificación. El número de esporas por abeja (intensidad de infestación del parásito) se cuantificó con un hemocitómetro bajo un microscopio de luz (Cantwell, 1970) (Figura 13).

1- Polifloral (PF):



80

80

80

2- *E. grandis* (Eg):



80

80

80

**Infección 100.000 esporas
de *Nosema* spp.**
3 días post emergencia

Estructura y diversidad bacteriana
7 y 10 días post emergencia
Illumina MiSeq

Recuentos de *Nosema* spp.
4, 7 y 10 días post infección

Análisis de supervivencia de abejas
Diariamente

Figura 13. Representación esquemática de diseño experimental II.

4.1.3. Análisis de supervivencia de las abejas

Las cajas con abejas se inspeccionaron diariamente. Se registró el número de individuos muertos en una tabla de datos y se removieron de sus jaulas. Al finalizar el ensayo (con la muerte de todas las abejas), se realizó el análisis de supervivencia. Para dicho análisis se empleó el Software *SigmaStat*, considerándose un nivel de confianza de 95%. Por cada tratamiento se realizaron curvas de supervivencia graficando el número de abejas vivas versus tiempo del experimento. Se empleó el test no paramétrico de Gehan-Breslow para determinar si las curvas de supervivencia presentaban diferencias significativas.

4.1.4. Caracterización del pan de polen

Con el propósito de determinar el origen botánico del pan de polen se colectó una muestra representativa de cada uno y se homogeneizó en ácido acético glacial para su observación por microscópico óptico. Los residuos se montaron en glicerina-gelatina con formol (Faegri *et al.*, 1975). La identificación de los granos de polen se realizó empleando un aumento de 1000X. Las preparaciones microscópicas de las muestras se analizaron cuantitativamente mediante el recuento de al menos 1200 granos de polen por portaobjetos por muestra (Louveaux *et al.*, 1978). Este procedimiento se realizó en colaboración con la Msc. Estela Santos (Facultad de Ciencias).

También se determinó la estructura y composición de la comunidad microbiana del pan de polen. Para esto se tomaron tres muestras de cada tipo de pan de polen (0,2 gramos/muestra), se resuspendieron en etanol 95% y se vortexearon. Luego, se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó. Este paso se repitió 5 veces hasta conseguir un volumen de 500 mg. Se añadió 1 ml de buffer TE (Tris-Cl 10 mM; pH 8.0; EDTA 1 mM). Las muestras fueron vortexeadas durante cinco minutos y centrifugadas a 20800 xg por dos minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado. Se añadieron perlas de cerámica y se homogeneizaron mediante *shaker* durante 30 segundos. El sobrenadante fue descartado y el volumen final se transfirió a un tubo nuevo estéril (Anderson *et al.*, 2014). Se agregaron 750 µl de la mezcla anterior en tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a alta velocidad durante cinco minutos. Posteriormente se extrajo el ADN de acuerdo a lo descrito por Zhou *et al.*, 1996, y se analizó la estructura y composición de la comunidad microbiana

mediante PCR-DGGE y secuenciación masiva, de acuerdo a lo descrito en el capítulo 1 de esta tesis.

4.1.5. Análisis de la diversidad de la comunidad microbiana intestinal

A los siete y diez días post emergencia (p.e) se tomaron 20 abejas por caja, de tres cajas por régimen nutricional (polen monofloral o polifloral). Las abejas se esterilizaron superficialmente sometiendo a dichas muestras en hipoclorito de sodio durante tres minutos y se enjuagaron con agua destilada tres veces con el fin de eliminar el remanente del hipoclorito. Posteriormente, extrajeron los intestinos y se generó un *pool* de 20 intestinos por caja (tres cajas por régimen nutricional). El ADN bacteriano se extrajo de cada *pool* mediante el protocolo descrito por Zhou *et al.*, 1996, y se sometió a PCR-DGGE, y a secuenciación masiva, de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1 de esta tesis.

4.1.6. Cuantificación bacteriana absoluta

Con el fin de estimar el número total de bacterias presentes en las muestras de pan de polen, así como en las muestras de abejas, se amplificó y cuantificó el número de copias del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S mediante de PCR en tiempo real. Se utilizaron los cebadores de bacterias generales 1114F (5'-CGGCAACGAGCGCAACCC-3') - 1275R (5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC-3') (Denman y Mc Sweeney, 2006). Cada reacción consistió de 10 µl SYBR (Power SYBR® Green PCR Master Mix), 0,6 µl de cada cebador (0,3 µM), 6,8 µl de agua libre de ARNasa y 40 ng de ADN. La reacción de PCR se realizó en un termociclador BIO-RAD CFX96™ Real Time system. El programa de ciclado consistió de una fase inicial de activación a 50°C por dos minutos y 95°C por 15 minutos, y 39 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. En cada corrida se incluyeron dos controles negativos (sin ADN). Con el fin de realizar la cuantificación absoluta, se construyó una curva estándar empleando diluciones seriadas (1/10) de una muestra de ADN de *Escherichia coli* XL1 Blue. En paralelo se estimó el número de bacterias correspondientes a cada dilución.

4.1.7. Respuesta inmune de las abejas

Diez abejas por régimen nutricional (monofloral y polifloral) del ensayo 1 se colocaron de forma individual en tubos de plástico de 2 ml y se homogeneizaron empleando una varilla de vidrio estéril con agua destilada. Una alícuota del homogeneizado de cada abeja se utilizó para determinar la ausencia de *Nosema* spp. mediante hemocitómetro y microscopía óptica de luz.

Posteriormente se realizó la extracción de ARN total de cada abeja empleando el mini kit RNeasy Plus (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit posee una columna que elimina el ADN genómico al inicio del proceso de extracción. El ARN total obtenido se empleó inmediatamente para generar el ADNc, empleando el kit Quantitec Reverse Transcription (Qiagen) (*random primers*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit también posee un paso de digestión del ADN genómico previo a la retrotranscripción. El ADNc obtenido se diluyó 1/10 en agua destilada estéril para su posterior uso. Estos procedimientos se realizaron en hielo con el fin de evitar la degradación del ARN.

El ADNc obtenido se empleó para analizar los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas vinculadas a la inmunidad, como vitelogenina, lisozima, glucosa deshidrogenasa, himenoptecina, defensina y abaecina, empleando cebadores previamente reportados (Yang and Cox-Foster, 2005; Evans *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007).

Los genes RPS5 y β -actina se emplearon como genes de referencia, para normalizar la variación de los niveles de ADNc. En la Tabla 4 se describen los cebadores utilizados. La mezcla de reacción consistió de QuantiTect SYBR Green PCR MasterMix (Qiagen) 1X, agua libre de ARNasa y 5 μ l de ADNc (dilución 1:10) en un volumen final de 25 μ l. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador BIO-RAD CFX96™ Real Time system. El programa de ciclado consistió de una fase inicial de activación a 50°C por 2 minutos y 95°C por 15 minutos, y 39 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. En cada corrida se incluyeron dos controles negativos (sin ADN). Con el fin de obtener las eficiencias de cada reacción, se construyó una curva estándar empleando diluciones seriadas (1/10) de una de las muestras de ADN.

Los resultados se analizaron por el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) usando como valor de referencia la media geométrica entre los niveles de expresión de los genes de β -actina y RPS-5.

Tabla 4. Secuencias de cebadores empleados para la amplificación de genes relacionados con la inmunidad mediante PCR en tiempo real.

Secuencia blanco	Secuencias de los cebadores	Referencia
β -actina F	5'-GTATGCCAACACTGTCCTTTCTG-3'	Yang y Cox-Foster, 2005
β -actina R	5'-AAGAATTGACCCACCAATCCA-3'	
Proteína ribosomal S5 F	5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG-3'	Evans, 2006
Proteína ribosomal S5 R	5'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-3'	
Abaecina F	5'-CAGCATTCGCATACGTACCA-3'	Evans, 2006
Abaecina R	5'-GACCAGGAAACGTTGGAAAC-3'	
Defensina F	5'-TGTCGGCCTTCTCTTCATGG-3'	Yang y Cox-Foster, 2005
Defensina R	5'-TGACCTCCAGCTTTACCCAAA-3'	
Himenoptecina F	5'-CTCTTCTGTGCCGTTGCATA-3'	Johnson <i>et al.</i> , 2009
Himenoptecina R	5'-GCGTCTCCTGTCATTCCATT-3'	
Vitelogenina F	5'-AGTTCCGACCGACGACGA-3'	Johnson <i>et al.</i> , 2009
Vitelogenina R	5'-TTCCTCCCACGGAGTCC-3'	
Dehidrogenasa F	5'-CTGCACAACCACGTCTCGTT-3'	Yang y Cox-Foster, 2005
Dehidrogenasa R	5'-ACCGCCGAAGAAGATTTGG-3'	
Lisozima F	5'-ACACGGTTGGTCACTGGTCC-3'	Yang y Cox-Foster, 2005
Lisozima R	5'-GTCCCACGCTTTGAATCCCT-3'	

4.2. RESULTADOS

Con el fin de analizar la variación de la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas asociada a su alimentación así como su vinculación con el sistema inmune y la susceptibilidad a patógenos, se realizaron dos ensayos.

4.2.1. *Ensayo experimental I: Rol de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en su sistema inmune*

Se emplearon abejas recién nacidas saludables (pertenecientes a colonias libres de *V. destructor* y libres de esporas de *Nosema* spp.), se las dividió en dos grupos y se alimentaron con diferentes regímenes nutricionales (pan de polen polifloral y monofloral proveniente de *E. grandis*).

De acuerdo al resultado del origen botánico del polen, el pan de polen monofloral estuvo compuesto por un 99% de polen proveniente de *E. grandis* mientras que el pan de polen polifloral consistió en polen de 18 orígenes botánicos diferentes, principalmente *Trifolium repens* (42,4 %), *Brassica* spp. (13,5%) y *Salix* spp. (8,1 %) (Tabla 5).

Tabla 5. Origen botánico del pan de polen empleado en el ensayo.

Régimen nutricional	Familia	Nombre científico	Porcentajes
	Fabaceae	<i>Trifolium repens</i>	42,4
	Brassicaceae	<i>Brassica</i> spp	13,5
	Salicaceae	<i>Salix</i> spp	8,1
	Fabaceae	<i>Parkinsonia aculeata</i>	6,2
	Anacardiaceae	<i>Schinus longifolius</i>	5,1
	Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> spp	5,1
	Solanaceae	<i>Solanum sisymbriifolium</i>	4,0
	Desconocido	-	3,1
Pan de polen	Fabaceae	<i>Glycenis</i> max	2,9
Polifloral	Ulmaceae	<i>Ulmus</i> spp	2,4
	Asteraceae	<i>Baccharis</i> spp 1	1,2
	Asteraceae	<i>Senecio</i> spp	1,2
	Lamiaceae	<i>Salvia</i> spp	1,0
	Asteraceae	<i>Baccharis</i> spp 2	1,0
	Fabaceae	<i>Vicia</i> spp	0,8
	Poaceae		0,7
	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	0,7
	Rutaceae	<i>Citrus</i> spp	0,6
	Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> spp	99
Pan de polen	Lamiaceae	<i>Salvia</i> spp	0,5
<i>E. grandis</i>	Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	0,3
	Poaceae		0,1
	Caprifoliaceae	<i>Lonicera japonica</i>	0,1

A la vez, se cuantificó la cantidad de bacterias presentes en las muestras de polen. Basados en la curva obtenida para la cuantificación absoluta (Eficiencia= 85,1%; $R^2=0,998$), se pudo estimar la cantidad de copias del gen ARN ribosomal 16S en cada muestra, obteniendo valores de $1,06 \times 10^8 \pm 7,23 \times 10^7$ por g de polen monofloral, y $3,79 \times 10^8 \pm 1,41 \times 10^8$ por g de polen polifloral (test de t, $p>0,05$). Esto indica que el inóculo bacteriano presente en ambos tipos de pólenes es similar.

Al analizar esta comunidad mediante secuenciación masiva, se obtuvieron 55.836 *reads* de los cuales 55.834 (99%) pasaron los umbrales de calidad. Los dos *reads* de diferencia correspondieron a secuencias identificadas como quimeras, las cuales se filtraron de la matriz de datos. Luego se alinearon dichas secuencias y se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) (con una identidad de 97%). Para una correcta asignación taxonómica de dichos OTUs y poder comparar las frecuencias de cada taxa entre las diferentes muestras, el conjunto de datos fue normalizado (agrupados por el menor número de secuencias de la librería) en 5.173 secuencias por muestra. Posteriormente se prosiguió con la eliminación de los *singletons* de la matriz de OTUs. La matriz resultante consistió de 71 OTUs.

Los *phyla* identificados correspondieron a Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria (*phylum* más abundantes). Si bien se encontraron los mismos *phyla* en ambos pólenes, a nivel de Genero/Familia la composición fue diferente (Figura 14, tabla 6). Las muestras provenientes de pan de polen de *E. grandis* presentaron una composición mayoritaria de bacterias pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae, seguidas de los géneros de *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Erwinia* y *Gluconobacter* mientras que las muestras de polen polifloral contenían Enterobacteriaceae pero una familia diferente a la detectada en las muestras de polen monoflorales, seguida de los géneros *Acinetobacter*, *Lactobacillus* y *Pseudomonas*. Los géneros *Acinetobacter* y *Erwinia* presentaron una abundancia significativamente mayor en muestras de polen de *E. grandis* comparadas con las muestras de polen poliflorales (t test, $t= -3,25$, $p=0,031$ / $t=-3,35$, $p=0,028$, respectivamente). Al realizar un PERMANOVA con los valores de abundancia de estos datos, se obtuvo que las comunidades pertenecientes a ambas dietas de polen fueron marginalmente significativas PERMANOVA (1000 permutaciones) $p=0,10$ (Figura 15).

Cuando se analizaron los valores correspondientes a los índices de Shannon de las diferentes muestras de pólenes, se pudo determinar que si bien no se observaron diferencias significativas entre los índices de los dos regímenes, las muestras

provenientes de pólenes poliflorales presentaron valores mayores a las muestras de *E. grandis*.

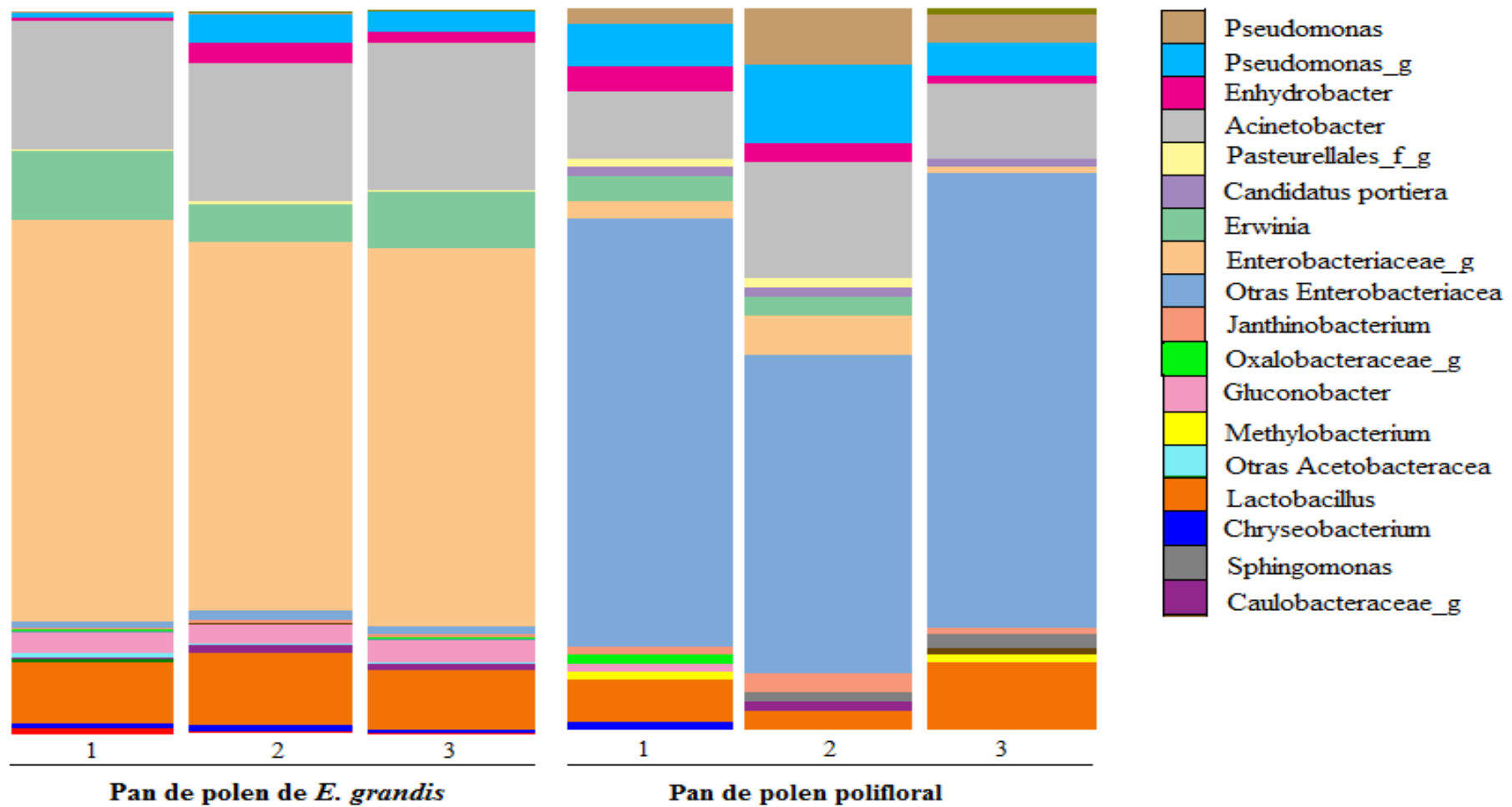


Figura 14. Géneros bacterianos obtenidos en la comunidad microbiana de las muestras de pan de polen polifloral y de *E. grandis*, empleado en el ensayo experimental I.

Tabla 6. Abundancias relativas de los OTUs bacterianos de la comunidad bacteriana y los índices de Shannon correspondiente a cada muestras de pan de polen utilizadas para las dietas polifloral (PF) y de *E. grandis* (Eg), empleado en el ensayo experimental I.

Orden	Familia	Género	Muestras de polen					
			<i>E. grandis</i>			Polifloral		
			1	2	3	1	2	3
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	0,2	0	0,1	8,0	3,8	2,3
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	-	0,5	2,7	4,0	10,7	4,8	5,8
Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Enhydrobacter</i>	0,5	1,6	2,9	2,7	1,0	3,5
Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	20,4	19	17,8	9,3	16	10,5
Pasteurellales	-	-	0,2	0,3	0,5	1,3	0	1,2
Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Candidatus portiera</i>	0	0	0	1,2	1,0	1,3
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>	9,6	7,7	5,3	2,7	0	3,5
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-	55,5	52,3	50,9	2,3	1,0	5,3
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>otros</i>	1,4	1,0	1,2	44	62,9	59,3
Burkholderiales	Oxalobacteriaceae	<i>Janthinobacterium</i>	0,2	0,4	0,3	1,2	1,0	2,7
Burkholderiales	Oxalobacteriaceae	-	0,2	0,1	0	1,2	0	0
Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Gluconobacter</i>	2,9	3,1	2,6	1,2	0	0
Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	0	1,2	0	0	1,0	0
Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>otras</i>	0,6	0,1	0,3	0	0	0
Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	8,5	8,1	10	5,8	2,7	9,5
Flavobacteriales	Weeksellaceae	<i>Chryseobacterium</i>	0,6	0,4	0,8	1,2	0	0
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	0	0	0	1,3	1,9	0
Caulobacterales	Caulobacteraceae	-	0,2	0,7	1,0	0	0	1,3
Índice de Shannon			1,93	2,08	1,97	2,93	2,07	2,89

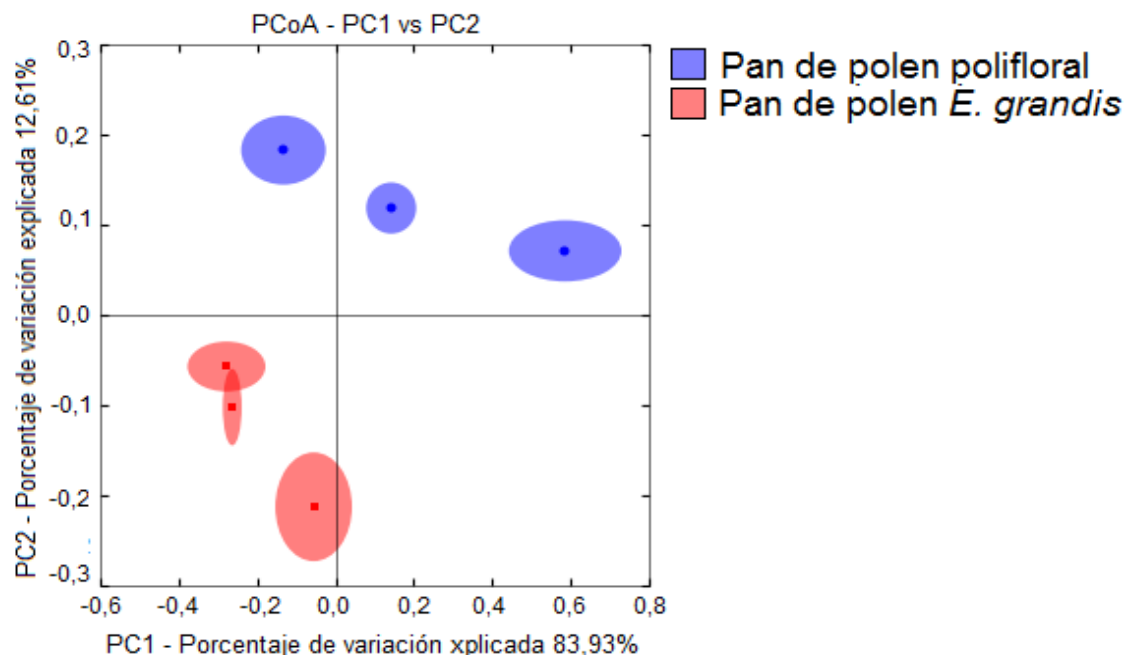


Figura 15. Análisis de coordenadas principales, β -diversidad - Unifrac

Las abejas que recibieron los diferentes tratamientos nutricionales (pan de polen polifloral y de *E. grandis*) se mantuvieron en incubadora durante dos meses. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de las abejas alimentadas con estos dos regímenes nutricionales (Test de Gehan-Breslow; Statistic= 5,56; p=0,351) (Figura 16).

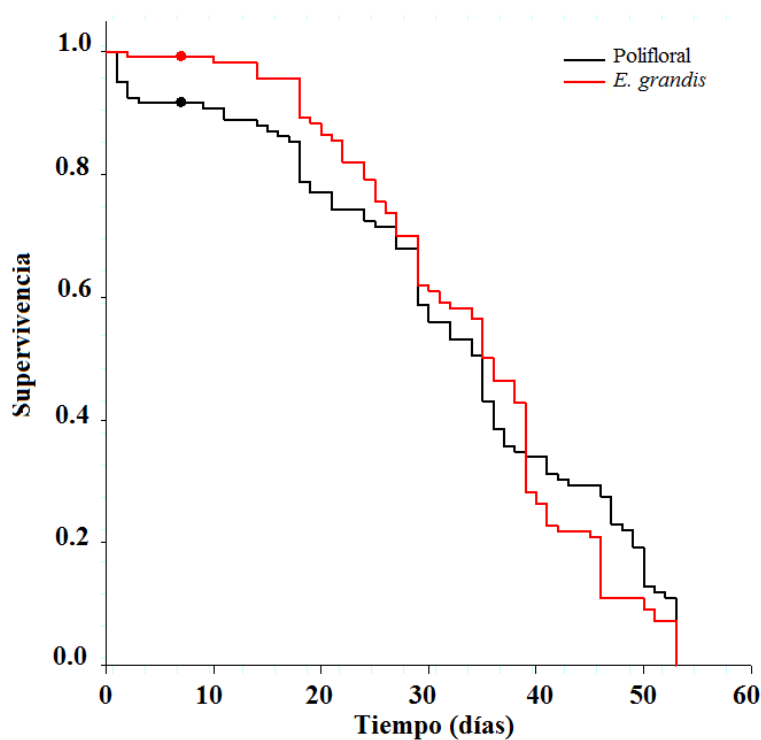


Figura 16. Curvas de supervivencia de abejas alimentadas con pan de polen polifloral y *E. grandis*-

La estructura de la comunidad microbiana intestinal de las abejas sometidas a los dos regímenes nutricionales se analizó mediante DGGE. En todos los casos, los patrones de bandas fueron obtenidos exitosamente, resultando reproducibles (Figura 15). No se observaron diferencias en la estructura de la comunidad microbiana intestinal de las abejas alimentadas con pan de polen polifloral y de *E. grandis*. Sin embargo se observa que las muestras obtenidas a los siete o diez días p.e. tienden a agruparse entre sí (Figura 17).

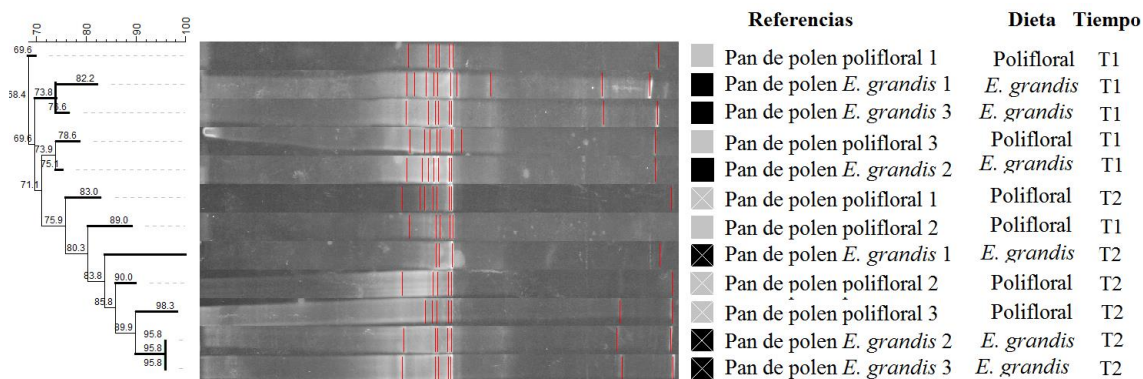


Figura 17. Efecto del pan de polen polifloral y del *E. grandis* sobre la estructura de la comunidad microbiana intestinal evaluada por DGGE. Los ensayos se realizaron por triplicados a 7 y 10 días p. e (T1 y T2 respectivamente).

En paralelo se cuantificó la cantidad de bacterias presentes en las abejas alimentadas con ambos tipos de pólenes, luego de diez días de administración. Se obtuvieron valores similares en ambos grupos de abejas ($3,97 \times 10^7 \pm 2,71 \times 10^7$ y $1,43 \times 10^7 \pm 4,85 \times 10^6$ para las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* y polifloral, respectivamente, eficiencia= 85,1% $R^2=0,998$, test de t, $p>0,05$). Esto indica que el tipo de alimentación no tiene un efecto sobre la cantidad de bacterias presentes en el intestino.

Al analizar la composición de esta comunidad mediante secuenciación masiva, se obtuvieron 232.345 reads de los cuales 221.576 (95%) pasaron los umbrales de calidad. Se identificaron un total de 221.560 secuencias únicas las cuales corresponden 814 OTUs (a una identidad de 97%) en el conjunto de datos enteros. Se eliminaron los singletons de estas secuencias, quedando con una tabla resultante de 159 OTUs. Posteriormente el conjunto de datos fue normalizado (agrupados al menor número de secuencias de la librería) en 29.372 secuencias por muestra, para luego asignar taxonomía a dichas OTUs.

Los *phyla* bacterianos fueron los mismos en abejas alimentadas con pan de polen polifloral y monofloral a los diez días post emergencia. Los OTUs más abundantes representaron a los *phyla* Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria (Figura 18, Tabla 7).

Analizando la composición bacteriana total pudimos observar que existe una tendencia significativa entre los dos grupos de abejas (PERMANOVA (1000 permutaciones)

p=0,1) (Figura 19). Sin embargo, Se puedo observar que las abejas alimentadas con pan de polen polifloral presentaron una abundancia de *Lactobacillus* spp. mayor que las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* (Test de Kruskal-Wallis, K=3,86, p=0,049), mientras que las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* mostraron una abundancia significativamente mayor de *Bartonellaceae* spp. (Test de Kruskal-Wallis, K=3,86, p=0,049).

De acuerdo con el análisis de rarefacción de OTUs, la riqueza en la comunidad microbiana intestinal de abejas alimentadas con pan de polen polifloral fue significativamente superior comparada con las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* (Figura 20). Sin embargo, los índices de diversidad de Shannon a nivel de genero fue significativamente superior en abejas sujetas al régimen de *E. grandis* comparada con el de polifloral (Test t student, t= 3,39, p=0,027) (Tabla 7).

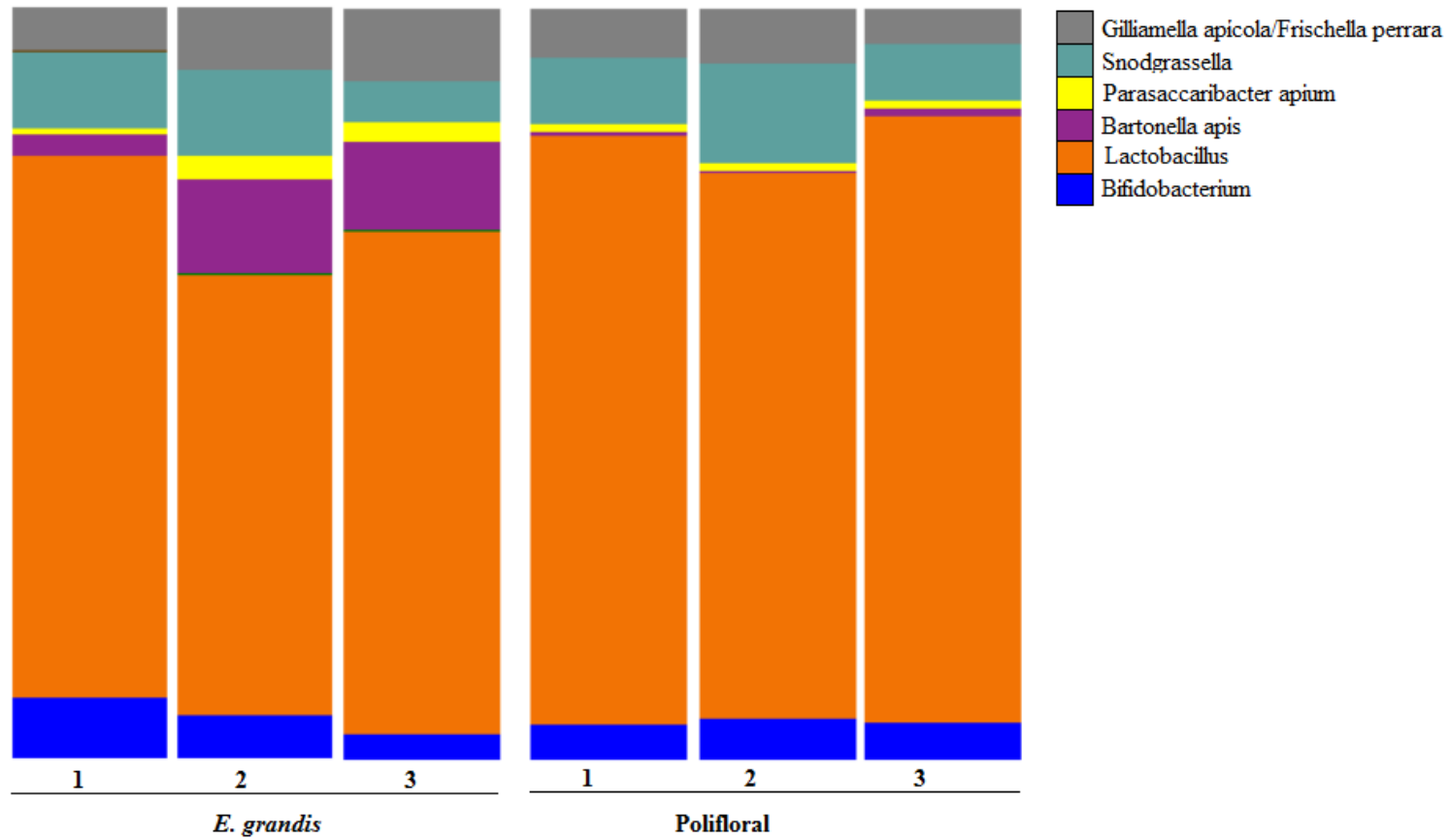


Figura 18. Géneros bacterianos correspondiente a cada muestra de abejas alimentadas con pan de polen polifloral (PF) y de *E. grandis* (Eg) a los 10 días p.e (T2).

Tabla 7. Abundancias relativas de géneros bacterianos y los índices de Shannon correspondiente a cada muestras de abejas alimentadas con pan de polen polifloral (PF) y de *E. grandis* (Eg) a los 10 días p. e (T2).

Orden	Familia	Género	Regímenes nutricionales					
			<i>E. grandis</i>			Polifloral		
			1	2	3	1	2	3
Pasteurellales	-	<i>Gilliamella apícola/ Frischella perrara</i>	5,9	9,9	8,4	4,7	7,3	6,6
Neisseriaceae	-	<i>Snodgrassella</i>	10,40	5,40	11,20	7,60	13,20	8,90
Acetobacteraceae	-	<i>Parasaccaribacter apium</i>	0,70	2,60	3,20	1,10	1,10	0,90
Rhizobiales	-	<i>Bartonella apis</i>	3,0	11,70	12,50	1,0	0,20	0,40
Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	71,70	67,00	58,70	80,50	72,60	78,10
Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium</i>	8,20	3,30	5,80	5,00	5,60	5,00
Índice de Shannon			2,96	3,38	3,16	2,81	2,68	2,72

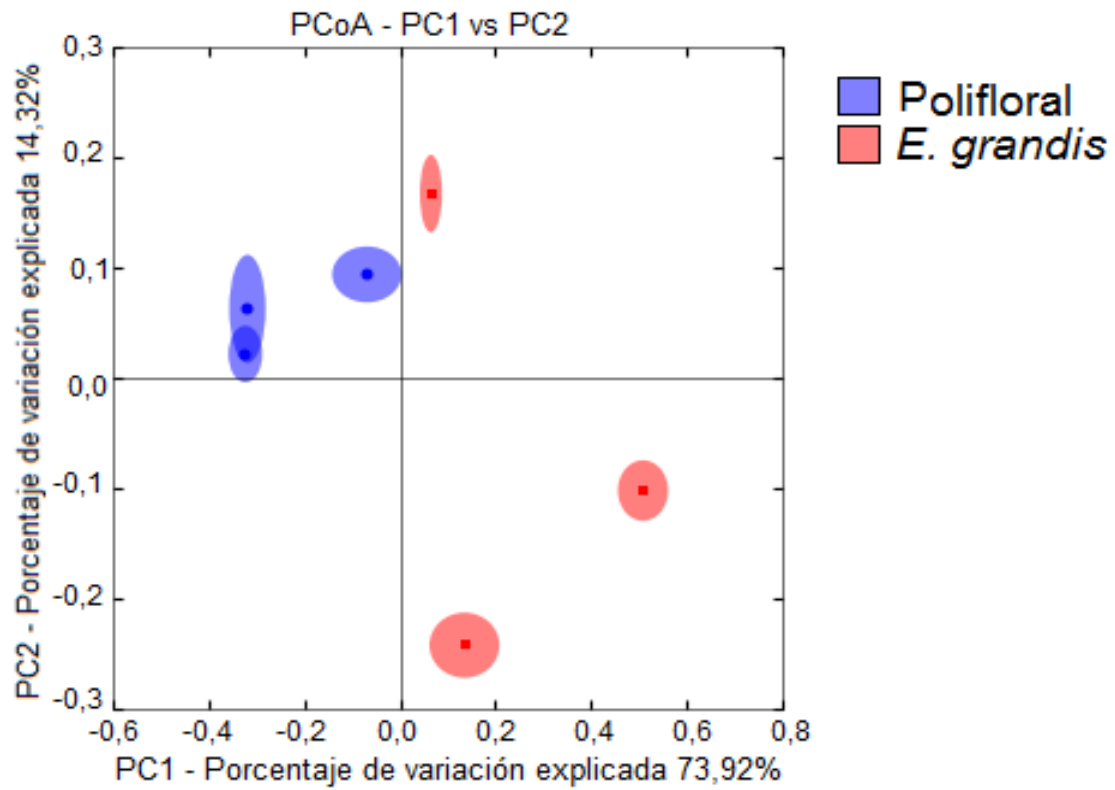


Figura 19. Análisis de principales coordenadas (PCoA) de beta-diversidad UniFrac weighted de las diferentes réplicas de muestras de abejas sometidas a los diferentes regímenes nutricionales.

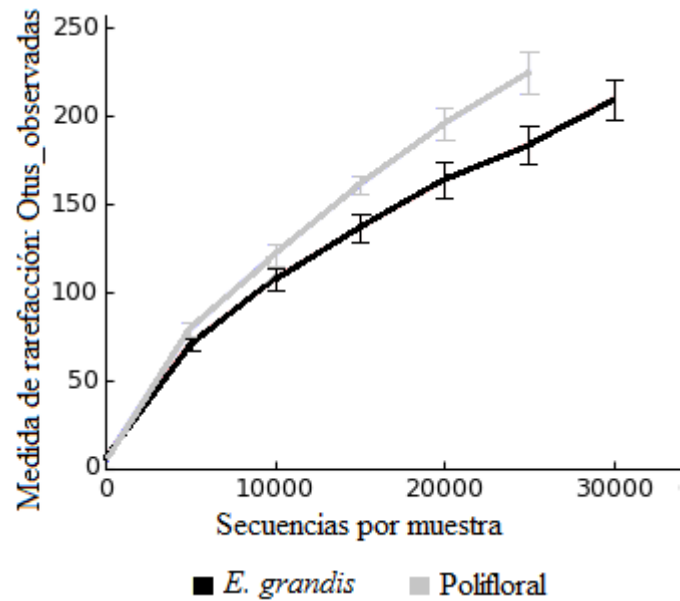


Figura 20. Curva de rarefacción de OTUs_observadas de las muestras de abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* y polifloral.

A los diez días de alimentación con pan de polen polifloral y monofloral de *E. grandis*, se analizó la expresión de genes vinculados a la inmunidad de la abeja. La expresión de los genes de lisozima, himenoptecina y vitelogenina fue significativamente menor en abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* con respecto a aquellas alimentadas con pan de polen polifloral (Test de Mann Whitney, $U=11$, $p=0,01$; $U=2$, $p=0,02$ and $U=21$, $p=0,05$, respectivamente). De acuerdo a los valores de ΔCt , la expresión de lisozima fue 3,7 veces, la expresión de himenoptecina fue 9,5 y la expresión de vitelogenina fue de seis veces menor en abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* que en las alimentadas con pan de polen polifloral. Por otro lado no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de la glucosa deshidrogenasa, abaecina y defensina en abejas sujetas a los diferentes regímenes nutricionales (Figura 21).

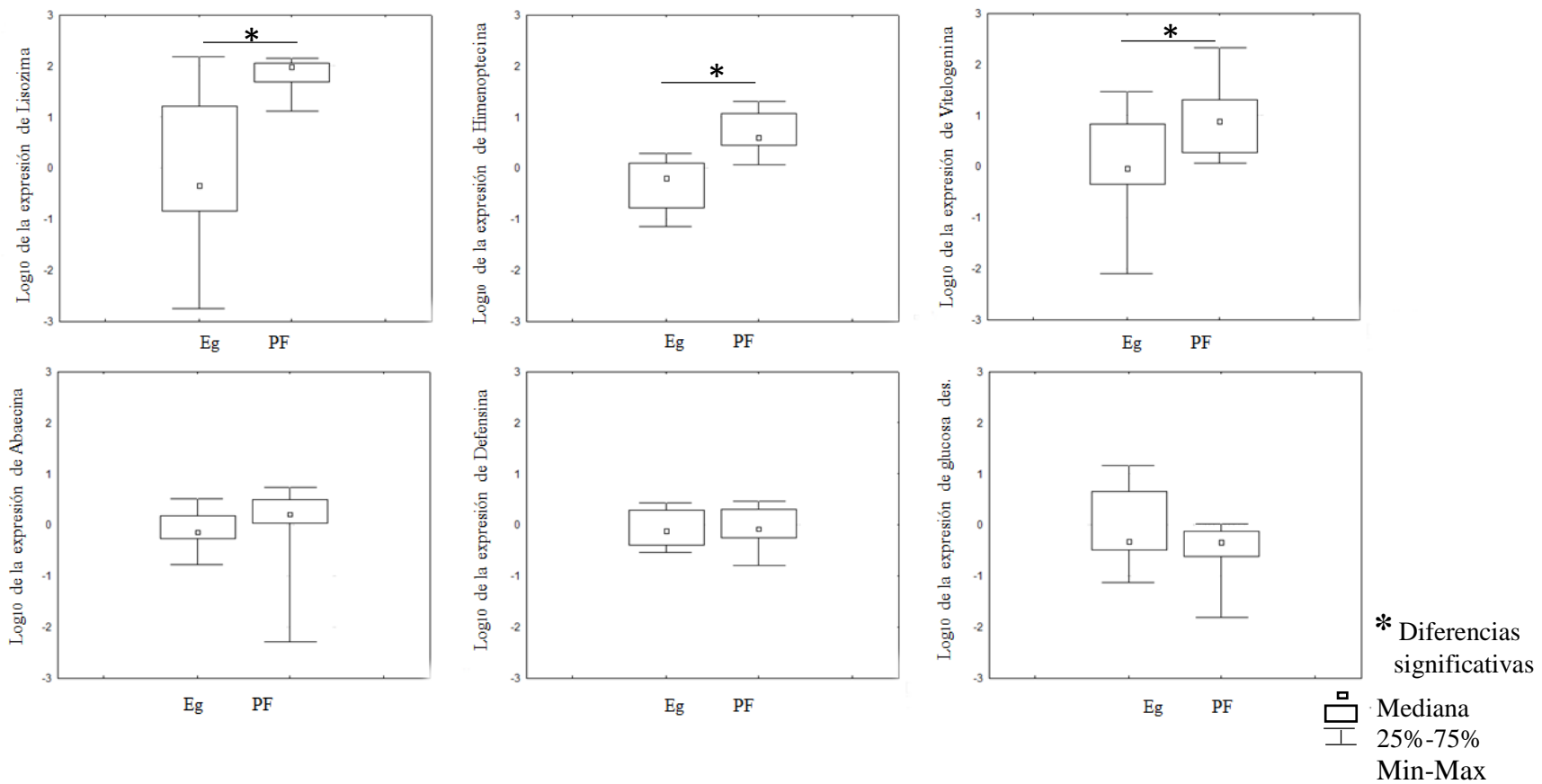


Figura 21. Efecto del pan de polen polifloral y de *E. grandis* sobre la expresión relativa de los genes de Lisozima, Defensina, Himenoptecina, Glucosa Deshidrogenasa, Abaecina y Vitelogenina (Test estadístico no paramétrico utilizado: Mann Whitney).

4.2.2. Ensayo experimental II: Rol de la alimentación en la comunidad microbiana de las abejas y en la susceptibilidad a patógenos

Una vez que se confirmó que la alimentación generaba cambios en la estructura de la comunidad bacteriana intestinal así como en la respuesta inmune de la abeja, se repitió el experimento con el fin de evaluar si esto también influía en la respuesta frente a la infección con patógenos.

Luego de 3 días post emergencia, las abejas alimentadas con pan de polen polifloral y de *E. grandis* se dividieron en dos subgrupos. Un subgrupo se infectó con esporas de *Nosema* spp. mientras que el otro constituyó el grupo control (sin infectar con esporas de *Nosema* spp.).

En este caso las abejas también fueron divididas en dos grupos y sujetas a diferentes regímenes nutricionales (pan de polen polifloral y de *E. grandis*). El pan de polen de *E. grandis* estuvo compuesto por un 98,7 % de polen proveniente de *Eucalyptus grandis*, mientras que el pan de polen polifloral consistió en pólenes de más de 10 orígenes botánicos diferentes principalmente *Baccharis trimera* (33,2 %), *Eucalyptus* spp (23,2%) y *Tipo allium cepa*. (21,2 %) (Tabla 8). Se cuantificó la cantidad de bacterias presentes en las dos muestras de polen obteniéndose los valores $1,16 \times 10^6 \pm 4,82 \times 10^5$ por g de polen polifloral, y $1,26 \times 10^7 \pm 1,11 \times 10^7$ por gramo de polen monofloral (Eficiencia= 102,1; $R^2= 0.99$; test t, $p>0,05$). Sugiriendo al igual que en el ensayo anterior, que el inóculo de bacterias es similar en los dos tipos de pólenes.

El análisis de la comunidad microbiana de las muestras de pan de polen utilizadas en este experimento obtuvo 55.013 *reads* de los cuales 55.011 (99,99%) pasaron los umbrales de calidad. Los 2 *reads* de diferencia correspondieron a secuencias identificadas como quimeras, las cuales se filtraron de la matriz de datos. El conjunto de datos se normalizaron a 4.627 secuencias por muestra. Posteriormente se eliminaron los *singletons* de la matriz de OTU. La matriz resultante consistió en 160 OTUs.

Como se observa en la Figura 22 y en la Tabla 9, la composición de las comunidades bacterianas asociadas al pan de polen polifloral y al monofloral de *E. grandis* presentaron los mismos *phyla* bacterianos: Firmicutes y Proteobacteria. Sin embargo, las abundancias de los géneros bacterianos no fue la misma. La abundancia relativa de los lactobacilos fue significativamente mayor en la dieta polifloral (t student,

t: -28,304; $p < 0.01$), siendo este género el más abundante en este régimen nutricional. Del mismo modo, el *phyla* predominante en las muestras de pan de polen monofloral de *E. grandis*, lo constituyeron las *Enterobacterias* (t student, t: 55,202; $p < 0.01$). Las *Acinetobacter* presentaron abundancias relativas mayores también en las muestras de pan de polen de *E. grandis* con respecto a la dieta polifloral (t student; t=3.48; $p=0.0259$).

De acuerdo a lo esperado, el índice de diversidad de Shannon fue significativamente mayor en el régimen de pan de polen poliflorales comparada con el régimen de *E. grandis* (t student, t:-4,13; $p=0,014$).

Tabla 8. Origen botánico del pan de polen empleado en el ensayo.

Régimen nutricional	Familia	Nombre científico	Porcentajes
Pan de polen	Asteraceae	<i>Tipo Baccharis trimera</i>	33,2
Polifloral	Myrtaceae	<i>Eucalyptus spp</i>	23,2
	Amaryllidaceae	<i>Tipo allium cepa</i>	21,2
	Desconocido	-	9,8
	Asteraceae	<i>Senecio spp</i>	6,3
	Fabaceae	<i>Lotus spp</i>	2,8
	Casuarinaceae	<i>Casuarina cunninghamiana</i>	1,4
	Poaceae	Pasto	0,7
	Fabaceae	<i>Trifolium pratense</i>	0,7
	Boraginaceae	<i>Echium plantagineum</i>	0,7
Pan de polen	Myrtaceae	<i>Eucalyptus spp</i>	98,7
<i>E. grandis</i>	Lamiaceae	<i>Salvia spp</i>	0,5
	Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	0,3
	Poaceae	-	0,1
	Asteraceae	<i>Baccharis spp</i>	0,1
	Asteraceae	<i>Solidago chilensis</i>	0,1
	Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	0,1

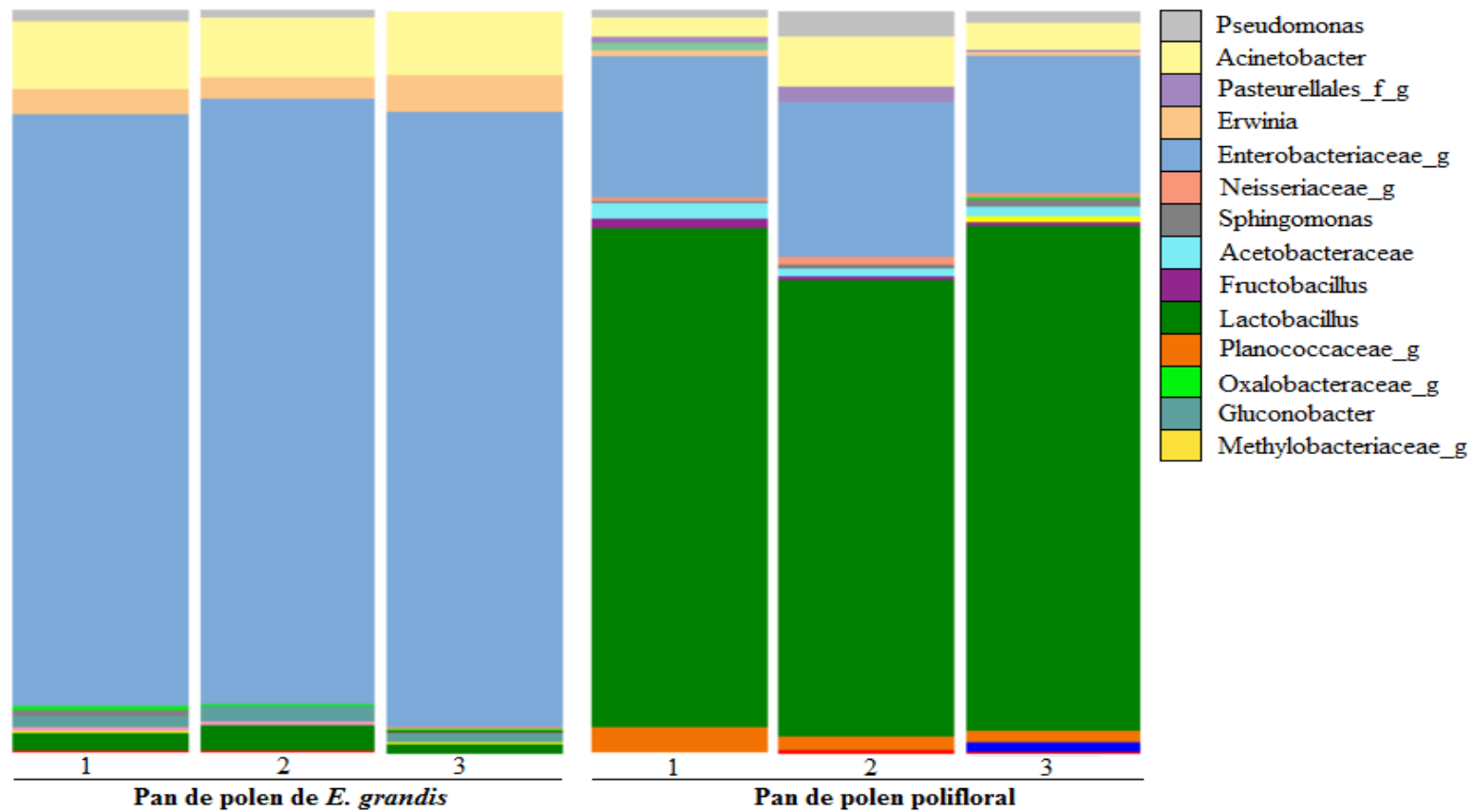


Figura 22. Géneros bacterianos pertenecientes a la comunidad bacteriana asociada a las muestras de pan de polen, empleado en el ensayo experimental II.

Tabla 9. Abundancias relativas de géneros bacterianos y los índices de Shannon correspondiente a las muestras de pan de polen polifloral (PF) y de *E. grandis* (Eg), empleado en el ensayo experimental II.

Orden	Familia	Género	Muestras de polen					
			<i>E. grandis</i>			Polifloral		
			1	2	3	1	2	3
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	1,5	0,9	0	3,4	1,5	0,9
Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	9,2	8,2	8,5	2,8	6,7	3,7
Pasteurellales	-	-	0	0	0,1	0,6	0,3	2,2
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>	3,5	2,9	4,8	0,3	0,6	0
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-	76,9	81,3	82,8	19,2	20,7	18,6
	Neisseriaceae	-	0	0	0,4	0,3	0,6	1,1
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	0,8	0,1	0	0,3	0,9	0,6
	Acetobacteraceae	-	0	0	0,1	1,2	2,2	1,1
	Lactobacillales	Leuconostocaceae	0	0	0	0,3	1,2	0,6
	Lactobacillales	Lactobacillaceae	2,3	3,2	1,3	67,2	68,1	61,5
	Bacillales	Planococcaceae	0	0	0	1,5	3,4	1,7
Burkholderiales	Oxalobacteriaceae	-	0,4	0,1	0,1	0	0	0,3
Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Gluconobacter</i>	1,7	2,1	1,3	0	0	0
Rhizobiales	Methylobacteriaceae	-	0,4	0,1	0,1	0	0	0,9
Índice de Shannon			1,55	1,31	1,39	1,85	2,28	1,95

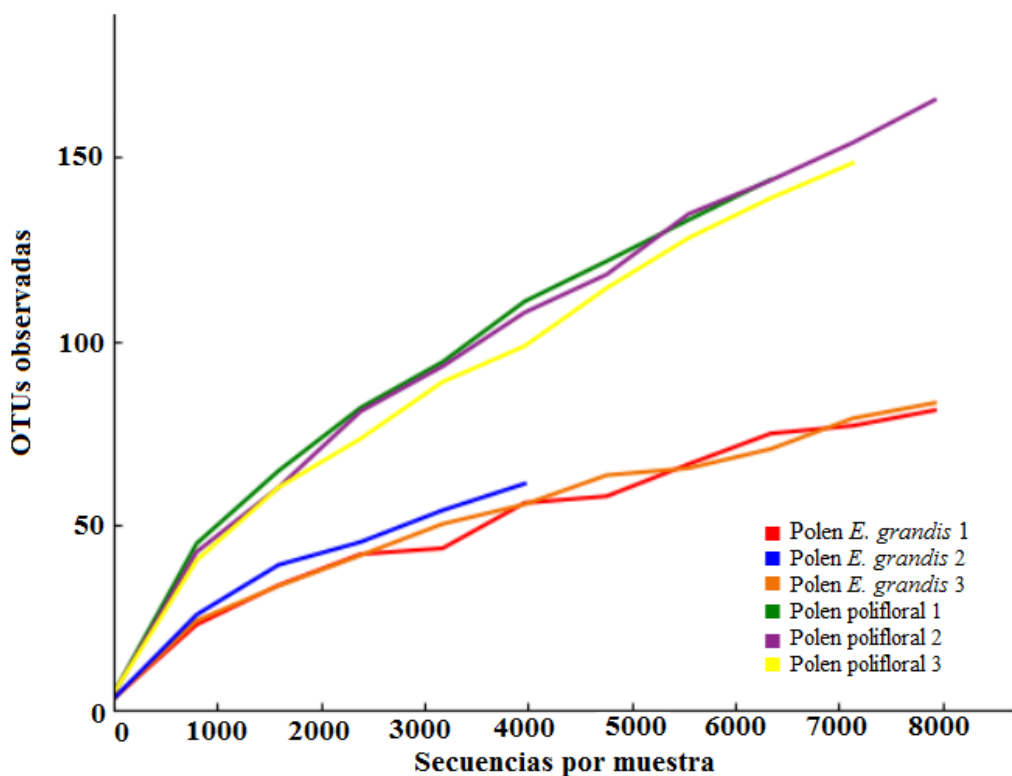


Figura 23. Curvas de rarefacción de las diferentes réplicas de muestras de pan de polen utilizadas en este capítulo.

Mediante las curvas de rarefacción observadas en el Figura 23, se demuestra que para una misma cantidad de secuencias obtenidas de la comunidad microbiana, la diversidad (número de OTUs observadas) difiere de acuerdo al régimen nutricional. Las muestras correspondientes al pan de polen polifloral presentaron una diversidad mayor (el doble) que la obtenida en el polen de *E. grandis*.

Se analizó el efecto de la infección con *Nosema* spp. y la alimentación en la estructura y composición de la comunidad bacteriana intestinal de las abejas. De acuerdo a los resultados de DGGE, no se identificaron cambios significativos asociados a estos tratamientos, sugiriendo que la estructura de la comunidad no se vería afectada (Figura 24). Por otro lado, las muestras tendieron a agruparse de acuerdo a la edad de las abejas.

En cuanto al número de bacterias totales en el intestino, se obtuvieron valores similares entre las abejas alimentadas con las dietas de pan de polen polifloral y monofloral pero que no fueron infectadas con esporas de *Nosema* spp. ($4,489 \times 10^8 \pm 1,97 \times 10^8$ y $1,867 \times 10^8 \pm 7,789 \times 10^6$ respectivamente, eficiencia= 102,1; $R^2= 0,99$, Mann-Whitney, $z=-1,443$, $p=0,14$), sugiriendo al igual que en el ensayo anterior, que el tipo de alimentación no tiene un efecto sobre la cantidad de bacterias presentes en el intestino. El número total de bacterias en abejas alimentadas con pan de polen polifloral y monofloral e infectadas con *Nosema* spp., también presentó valores similares ($9,13 \times 10^7 \pm 4,08 \times 10^7$ y $1,40 \times 10^9 \pm 1,60 \times 10^9$ por abeja, respectivamente, Mann-Whitney $z=-1,746$, $p=0,08$). Cuando se analizaron los valores obtenidos para las muestras de abejas alimentadas con pan de polen polifloral infectadas con *Nosema* spp., con las abejas que recibieron la misma alimentación pero no fueron infectadas, no se observaron diferencias significativas, al igual que con las abejas que recibieron pan de polen monofloral (Mann-Whitney, $z=-1,44$, $p<0,05$; $z=-1,746$, $p<0,05$, respectivamente).

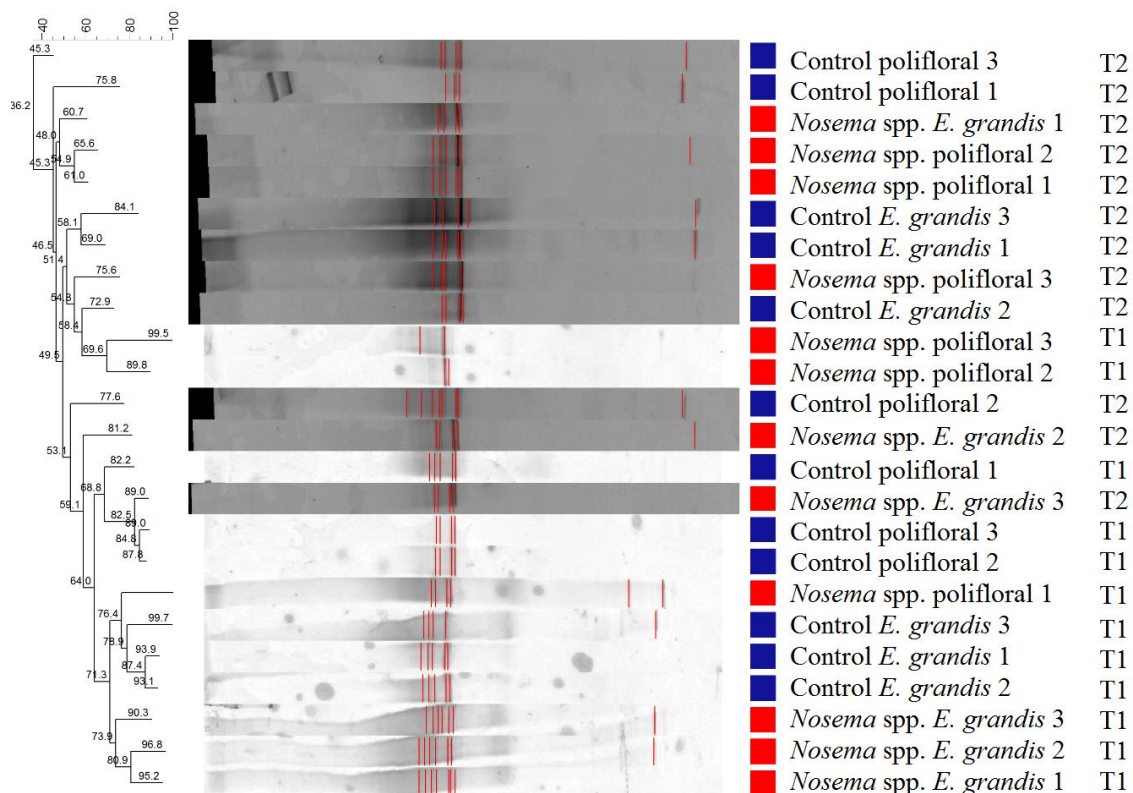


Figura 24. Análisis mediante PCR- DGGE de la comunidad microbiana intestinal de abejas alimentadas con pan de polen polifloral o monofloral de *E. grandis* e infectadas con *Nosema* spp., T1: 4 días post infección con *Nosema* spp., T2: 7 días post infección.

Al analizar la comunidad bacteriana mediante secuenciación masiva, se obtuvieron 712.706 *reads* de las cuales 712.600 (99%) pasaron los filtros de calidad. Posteriormente, la tabla de OTUs se normalizó al menor número de secuencias de todas las muestras (23.399 secuencias por muestra) quedando en una matriz de 112 OTUs.

Los *phyla* bacterianos obtenidos a los 7 días post infección (diez días post emergencia) fueron los mismos para todos los tratamientos, coincidiendo con los identificados previamente en este trabajo. Estos *phyla* correspondieron a Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria (Figura 25, tabla 10).

La alimentación diferencial al igual que la infección por *Nosema* spp. incidieron en la composición de la comunidad bacteriana (PERMANOVA (1000 permutaciones) $p=0,02$). Cuando se analizó la composición de la comunidad microbiana intestinal de abejas que solo recibieron alimentación diferencial de polen pero no fueron infectadas con *Nosema* spp., se observó una diferencia marginal significativa en dichos grupos de abejas (PERMANOVA (1000 permutaciones) $p=0,09$). Mientras que cuando se comparó la composición de esta comunidad microbiana intestinal de aquellas abejas alimentadas con pan de polen polifloral sin infectar con aquellas abejas que también recibieron pan de polen polifloral y que además se les administraron esporas de *Nosema* spp., no se evidenciaron diferencias significativas (PERMANOVA (1000 permutaciones) $p=0,41$). En cambio, cuando se comparó la composición la comunidad microbiana intestinal de abejas alimentadas con pan de polen de *E.grandis* sin infectar con aquellas abejas que también recibieron pan de polen de *E.grandis* y que además se les administraron esporas de *Nosema* spp., la composición de la comunidad de ambos grupos fueron marginalmente diferentes (PERMANOVA (1000 permutaciones) $p=0,09$) (Figura 26); lo que sugeriría que cuando las abejas presentan una alimentación diversa y aunque se encuentren infectadas con *Nosema* spp., su comunidad no se ve afectada. Sin embargo, cuando las abejas se alimentan con una dieta pobre como lo es en este caso, el polen de *E. grandis*, y son infectas por *Nosema* spp., la composición de su microbiota se ve comprometida.

Como ejemplo, se pudo observar en abejas sanas alimentadas con polen polifloral una mayor abundancia de *Bifidobacterium* comparadas con aquellas abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* (t student, $t=3,375$ - $p=0,043$ / $t=4,557$ - $p=0,019$, respectivamente). En abejas infectadas, las alimentadas con polen polifloral también presentaron mayor abundancia de *Snodgrassella* spp. con respecto a las abejas

alimentadas con pan de polen de *E. grandis* (t student, $t=2,832$, $p=0,047$ / $t=4,689$, $p=0,009$, respectivamente).

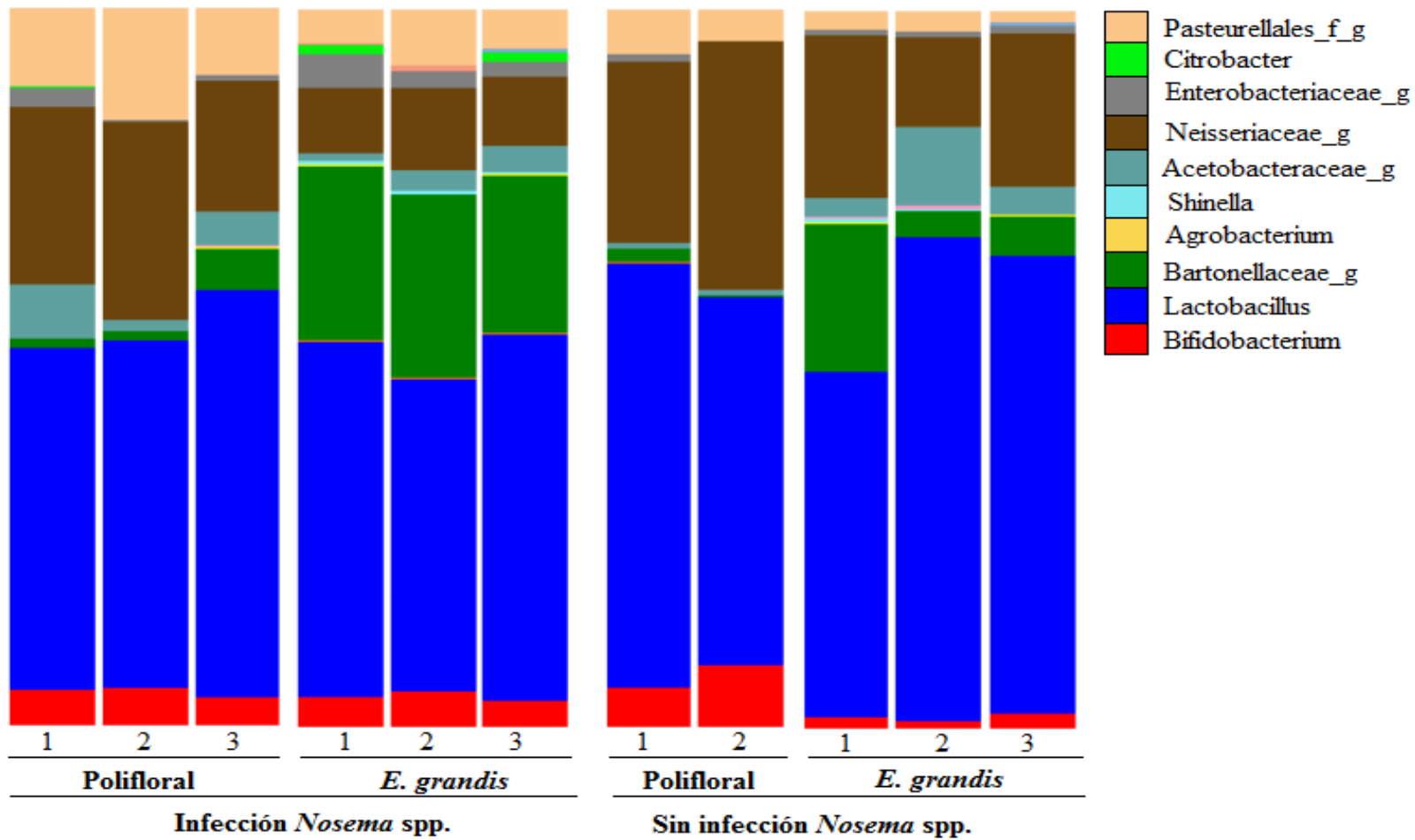


Figura 25. Géneros bacterianos correspondiente a cada muestras de abejas alimentadas con dietas polifloral (PF) y de *E. grandis* (Eg), infectadas con *Nosema* spp, y las muestras controles correspondiente a cada régimen nutricional a los 7 días post infección (T2).

Tabla 10. Abundancias relativas de géneros bacterianos correspondiente a cada muestras de abejas alimentadas con dietas polifloral (PF) y de *E. grandis* (Eg), infectadas con *Nosema spp*, y las muestras controles correspondiente a cada régimen nutricional a los 7 días post infección (T2).

Orden	Familia	Género	Infección <i>Nosema spp</i> , Polifloral			Sin infección <i>Nosema spp</i> , <i>E. grandis</i>			Polifloral			<i>E. grandis</i>		
			1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	3	
Pasteurellales	-	<i>Gilliamella apícola, Frischella perrara</i>	10,8	15,6	9,4	4,7	7,8	5,5	6,3	4,4	2,5	3,0	1,6	
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Citrobacter	0,4	0	0	1,3	0,1	1,1	0	0,1	0,2	0	0	
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	-	2,6	0,1	0,7	4,8	2,4	2,0	1,0	0	0,7	0,7	0,9	
	Neisseriaceae	-	24,7	27,6	18,2	9,2	11,4	9,7	25,3	34,4	22,6	12,4	21,4	
	Acetobacteraceae	-	7,4	1,6	4,8	1,0	2,8	3,6	0,7	0,8	2,	11,0	3,9	
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	0	0	0,1	0,5	0,4	0,4	0	0	0,5	0,1	0,1	
	Rhizobiales	Rhizobiaceae	0	0	0,1	0,2	0,2	0,2	0	0	0,2	0,1	0,1	
	Rhizobiales	-	1,1	1,3	5,9	24,1	25,5	21,9	1,9	0,2	20,7	3,6	5,6	
	Lactobacillales	Lactobacillaceae	47,8	48,4	56,7	49,6	43,4	51,0	59,1	51,3	48,1	67,3	63,8	
	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	4,8	5,2	3,9	4,2	5,1	3,8	5,5	8,6	1,6	1,1	2,0	
Índice de Shannon			3,47	3,14	3,45	3,24	3,43	3,42	2,83	2,92	3,13	3,21	3,05	

De acuerdo con el análisis de rarefacción de OTUs de la riqueza de la comunidad microbiana intestinal, se pudieron observar diferencias significativas entre los tratamientos de abejas con diferentes regímenes alimenticios e infectadas con esporas de *Nosema* spp. Las abejas alimentadas con pan de polen polifloral e infectadas con *Nosema* spp. presentaron un número de OTUs menor que aquellas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* e infectadas (t student, $t=-5,143$ $p=0,006$). De forma similar, las abejas alimentadas con pan de polen polifloral presentaron menor número de OTUs que aquellas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* (t student, $t=-3,18$ $p=0,05$). Estas diferencias se pueden corroborar también comparando los índices de Shannon entre los tratamientos. Las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* e infectadas presentaron significativamente índices mayores que las abejas únicamente alimentadas con pan de polen de *E. grandis* (t student, $t=3,026$ $p=0,038$). Del mismo modo, abejas alimentadas con pan de polen polifloral e infectadas con esporas de *Nosema* spp. presentaron significativamente índices mayores que las alimentadas únicamente con pan de polen polifloral (t student, $t=3,4$ $p=0,043$). En cuando a las abejas alimentadas con los diferentes regímenes nutricionales y sin infectar, se pudo observar que las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* presentaron valores de índices de Shannon significativamente mayores que las alimentadas con pan de polen polifloral (t student, $t=-3,72$ $p=0,033$).

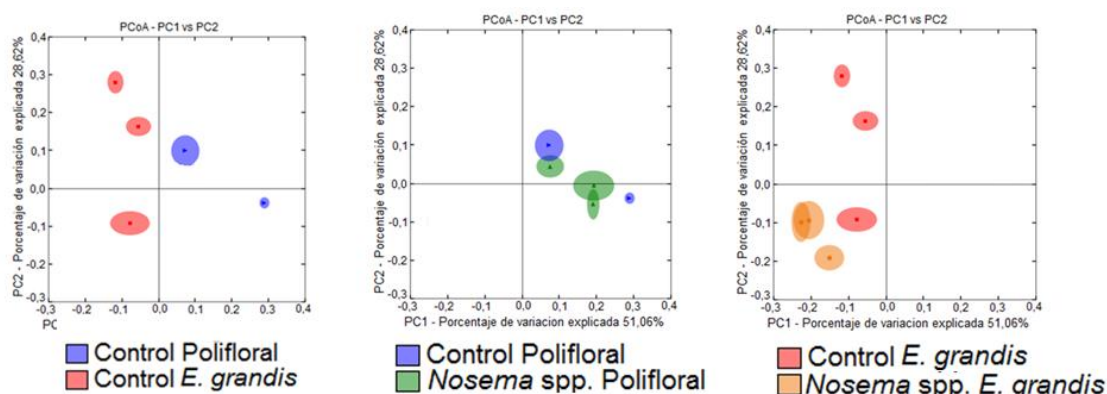


Figura 26. Análisis de coordenadas principales β diversidad – Unifrac de los cuatro tratamientos empleados.

En las abejas sometidas a los diferentes regímenes alimenticios e infectadas, el número de esporas en el intestino aumentó gradualmente, sin embargo, a los 4 y 7 días post infección, el número de esporas fue significativamente mayor en las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* comparado con las que recibieron polen polifloral (t student, $t=-4,014$ $p=0,016$; $t=-3,021$ $p=0,039$, respectivamente). A los 12 días de infección, el número de esporas llegó a $7,41 \pm 6,34$ log esporas/abeja en las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* y $7,36 \pm 6,46$ log esporas/abeja en las alimentadas con pan de polen polifloral. No se detectaron esporas de *Nosema* spp. en las abejas pertenecientes a los grupos controles (no infectados artificialmente) alimentados con pan de polen polifloral y de *E. grandis* (Figura 27).

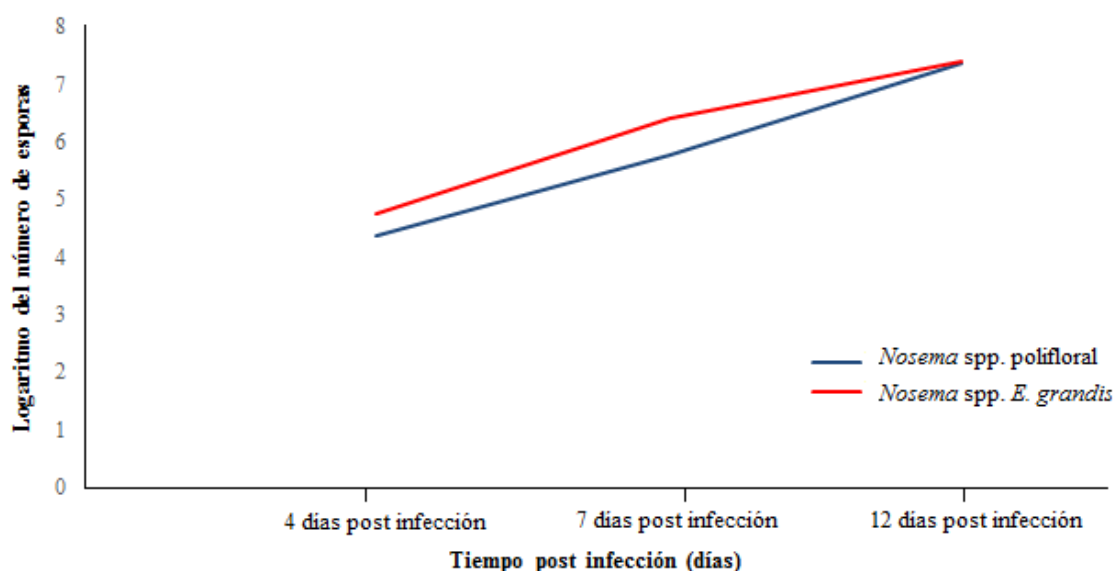


Figura 27. Desarrollo de *Nosema* spp. en el intestino de abejas alimentadas con pan de polen polifloral y pan de polen de *E. grandis* a los días 4, 7 y 12 post infección.

Las abejas infectadas con esporas de *Nosema* spp. y alimentadas con pan de polen de *E. grandis* tuvieron una mayor mortalidad que en aquellas abejas alimentadas con polen polifloral, aunque esta diferencia no resultó significativa (Test de Gehan-Breslow, Estadístico= 2,369 y $p=0,124$, Figura 28).

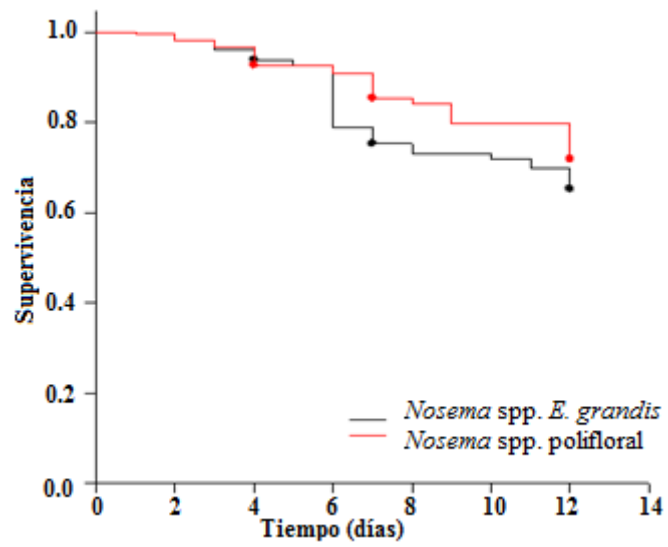


Figura 28. Curvas de supervivencia de abejas alimentadas con dietas de pan de polen polifloral y *E. grandis* e infectadas con esporas de *Nosema* spp.

4.3. DISCUSIÓN

El estudio de la comunidad microbiana bacteriana intestinal de *A. mellifera* en condiciones de salud indica que su composición es estable y similar en abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* y polifloral. Los mismos géneros bacterianos se encontraron en ambos grupos.

El grupo dominante estuvo formado principalmente por *Gilliamella apícola*, *Frischella perrara*, *Snodgrassella* spp., *Parasaccharibacter apium*, *Bartonella* spp., *Lactobacillus* spp., y *Bifidobacterium* spp. en concordancia con lo ya antes mencionado y reportado por otros autores (Vásquez *et al.*, 2012; Moran *et al.*, 2012). Si bien la estructura de la comunidad microbiana intestinal de las abejas es estable de acuerdo a los resultados obtenidos, el régimen nutricional en las abejas es capaz de generar alteraciones en esta comunidad, especialmente en la abundancia de diferentes géneros pertenecientes al núcleo bacteriano. En particular, el pan de polen polifloral incrementó las abundancias de *Lactobacillus* spp., *G. apícola* y *Bifidobacterium* spp., mientras que el pan de polen de *E. grandis* aumentó la abundancia de las *Bartonella* spp. Interesantemente, estos cambios asociados a la alimentación, no se deben a que estos grupos bacterianos eran mayoritarios en el polen y por eso aumentaron su abundancia en las abejas. De hecho, no se identificó la presencia de *Bartonella* spp. en el polen de *E. grandis*. El polen (o los microorganismos presentes en él) serían capaces de estimular la multiplicación de otros grupos bacterianos ya presentes en la comunidad microbiana intestinal de las abejas.

Los lactobacilos son las bacterias del ácido láctico (LAB) más abundantes encontradas en el tracto gastrointestinal de diferentes especies (Reuter, 2001), incluyendo a las abejas (Rada *et al.*, 1997; Gilliam, 1997). Estas especies bacterianas se encuentran normalmente en conjunto con las *Bifidobacterium* spp. y son ampliamente utilizadas como probióticos en humanos y animales para promover su salud (Reuter, 2001). Incluso se ha propuesto su asociación con efectos positivos sobre la salud de las abejas melíferas (Audisio and Benitez-Ahrendts, 2011; Vasquez *et al.*, 2012; Ambika Manirajan *et al.*, 2016). Se ha descrito que son capaces de modular el sistema inmune de las abejas, así como producir sustancias antimicrobianas (ácido fórmico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otros) con actividad frente a patógenos (Evans and López, 2004; Servin, 2004; Ventura *et al.*, 2009; Audisio and

Benitez-Ahrendts 2011; Vásquez *et al.*, 2012). Estas características las convierten en marcadores del estatus “saludable” de la abeja (Rangberg *et al.*, 2015, Ambika Manirajan *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la administración de pan de polen polifloral a las abejas genera un aumento en la abundancia de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, sugiriendo que esta estrategia podría ser de utilidad para mantener un estado saludable y prevenir la infección por patógenos.

Por otro lado, la familia *Bartonellaceae* incluye patógenos intracelulares facultativos presentes en una variedad de mamíferos (Chomel *et al.*, 2010), que son usualmente adquiridas por transmisión por vectores, picaduras o arañazos de animales. Se conocen una gran variedad de artrópodos que transmiten esta especie bacteriana (Jeyaprakash *et al.*, 2003). Hubert y colaboradores., (2015), demostraron que el ácaro *V. destructor* es reservorio de esta bacteria, pero la significancia de la bacteria *Bartonella* sobre la salud y fisiología de varroa así como el rol de este ácaro en la transmisión de bacterias hacia las abejas, es desconocida (Kopecky *et al.*, 2014). En esta tesis se pudo asociar la administración de pan de polen de *E. grandis* con una mayor abundancia de este género.

Además de la nutrición, la infección con *Nosema* spp. también generó cambios en la comunidad bacteriana, asociándose a una disminución en los *Lactobacillus* y aumento de *Giallamella*. También se observó un efecto interactivo entre ambos factores, generando cambios principalmente en el núcleo bacteriano intestinal de las abejas.

Más allá de los cambios en la comunidad microbiana intestinal, la nutrición también tuvo implicancias directas en la fisiología de la abeja, específicamente en su sistema inmune. Las abejas alimentadas con pan de polen de *E. grandis* presentaron una menor expresión de genes vinculados a la inmunidad que las abejas alimentadas con pan de polen polifloral. Alaux y colaboradores., (2010) demostraron previamente que los regímenes nutricionales monoflorales deprimen ciertas funciones inmunes comparados con los poliflorales, particularmente la actividad de la glucosa oxidasa (GOX). En este trabajo, los genes cuya expresión se vieron afectadas fueron himenoptecina, lisozima y vitelogenina. La himenoptecina es un péptido antimicrobiano que inhibe el crecimiento de bacterias gram-negativas y gram-positivas (Casteels *et al.*, 1993). La lisozima es un factor inmune no específico sintetizado por las glándulas salivares de las abejas trabajadoras, presente también en la miel (Bogdanov, 1997) y activa frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas. Algunos autores han observado que la lisozima puede

promover la expresión de otros péptidos antimicrobianos (Imler and Bulet, 2005). Finalmente, la vitelogenina ayuda a integrar la organización social a través de sus efectos pleiotrópicos sobre la división del trabajo y especialización de forrajeo (Amdam and Omholt, 2003; Nelson *et al.*, 2007). Además, esta proteína ha sido asociada con la resistencia al estrés oxidativo (Seehuus *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007).

El alto número de esporas de *Nosema* spp. encontradas en las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* en comparación con las que se le administro polen polifloral, se explicaría entre una menor abundancia de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* y una respuesta inmune “debilitada” asociadas al consumo de polen de *E. grandis*, lo que podría incrementar la vulnerabilidad de las abejas a infecciones por diferentes patógenos. De hecho, en este trabajo se comprobó que en las abejas alimentadas con polen de *E. grandis*, se produjo un mayor desarrollo del patógeno *Nosema* spp durante los primeros 7 días post-infección. Estos resultados confirman que la alimentación afecta al sistema inmune del individuo así como en el desarrollo de los patógenos, lo que se planteaba como tercera hipótesis en esta Tesis.

Esto coincide con lo observado en el campo, cuando las colmenas son trasladadas a plantaciones de *E. grandis* (Mendoza *et al.*, 2012). Si las colmenas no son retiradas antes de culminada la floración, la colmena muere debido a la infección por *Nosema* spp., pero si son retiradas a zonas con mayor diversidad polínica, las colmenas logran recuperarse.

Estos resultados constituyen un aporte al entendimiento de las causas de pérdidas de colmenas en áreas de monocultivos, principalmente en las plantaciones de *E. grandis*. El estrés nutricional de las abejas en el periodo de floración de *E. grandis* (que genera una disminución en la abundancia de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* y una respuesta inmune “debilitada”), sumado a la presencia de *N. ceranae* podría explicar las pérdidas frecuentes de colonias. Sumado a esto, también se ha reportado que el polen de eucaliptus es deficiente en aminoácidos esenciales (isoleucina), lo que podría afectar la fisiología de la abeja (Stace y White, 1994). A la vez, este trabajo puede tomarse como punto de partida para el diseño de estrategias que permitan mejorar la salud de las abejas, basadas en suplementos alimenticios compuesto de polen polifloral. Este tipo de polen favorecería la respuesta inmune de la abeja, a la vez que potencia su comunidad microbiana favoreciendo el desarrollo de bacterias benéficas.

5. CONCLUSIONES

1. La comunidad bacteriana intestinal de las abejas varía durante el desarrollo del individuo. Su variación es mayor en los primeros estadios del desarrollo, y al llegar a las últimas etapas la composición se estabiliza.
2. La diversidad de la microbiota varía gradualmente a lo largo de las estaciones del año, posiblemente asociado a la variación de fuentes de polen.
3. La comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas adultas está compuesta por un núcleo estable, pero la estructura de esta comunidad puede ser influenciada por el régimen alimenticio.
4. Estas alteraciones tienen consecuencias en el sistema inmune del individuo.
5. A la vez, esto impacta sobre el desarrollo de patógenos como *Nosema* spp.
6. El pan de polen polifloral favoreció el desarrollo de géneros bacterianos potencialmente benéficos (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) y, a la vez, fue capaz de retrasar el desarrollo del microsporidio *N. ceranae*.

6. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido comprender el efecto de la alimentación y de las variaciones de la microbiota intestinal en la respuesta inmune de las abejas melíferas así como en la susceptibilidad a *Nosema* spp. Estos resultados han sentado la base para el desarrollo de un proyecto que se está realizando actualmente, el cual busca evaluar el rol de la suplementación con polen polifloral en colmenas que son trasladadas a plantaciones de *E. grandis*. Se espera que la administración de polen polifloral refuerce el sistema inmune y disminuya la infección por *Nosema* spp. Esto podría ser una estrategia interesante para el manejo de las colmenas, pudiendo ser rápidamente implementada por apicultores. Dicho proyecto de investigación es parte de la Tesis de Doctorado de la Mag. Belèn Branchiccela.

Por otro lado, sería interesante evaluar cual es el impacto de otros factores de estrés, como la presencia de agroquímicos, en la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas; y como influyen estos en su salud. A la vez, sería interesante estudiar si es posible modular esta comunidad mediante la administración de microorganismos probióticos.

7. REFERENCIAS

- Aizen, M. A., Harder, L. D. 2009.** The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr Biol* 19: 915-918.
- Aizenberg-Gershtein, Y., Izhaki, I., Halpern, M. 2013.** Do honeybees shape the bacterial community composition in floral nectar?. *PloS one* 8: e67556.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y. 2010.** Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Lett* 6: 562-565.
- Alaux, C., Dante, C., Parrinello, H., Le Conte, Y. 2011.** Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics* 12: 496.
- Amdam, G.V., Omholt, W. 2003.** The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *J Theor Biol* 223: 451-464.
- Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W. 2004.** Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J Econ Entomol* 97:741-747.
- Ament, S. A., Wang, Y., Robinson, G. E. 2010.** Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *WIREs Syst. Biol Med* 2: 566-576.
- Ambika Manirajan, B., Ratering, S., Rusch, V., Schwiertz, A., Geissler-Plaum, R., Cardinale, M., Schnell, S. 2016.** Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species specificity. *Environ Microbiol* 18: 5165-5174.
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Eckholm, B. J., Mott, B. M., DeGrandi-Hoffman, G. 2011.** An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insect Soc* 58: 431-444.
- Anderson, K. E., Carroll, M. J., Sheehan, T., Mott, B. M., Maes, P., Corby-Harris, V. 2014.** Hives-Stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Mol Ecol* 23: 5904-5917
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L. 2013.** Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8: e83125.
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campa, J., Zunino, P., Antunez, K. 2015.** Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *J Apicul Res* 54: 532-540.

- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., Zunino, P. 2004.** *Paenibacillus larvae* larvae spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J Invertebr Pathol* 86:56-58.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Zunino, P. 2005.** Detection of of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *J Invertebr Pathol.* 90: 69-72.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P. 2006.** Honeybee viruses in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 93:67–70.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martin-Hernandez, R., Zunino, P. 2015.** Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microb Ecol* 70: 522-533.
- Audicio, M. C., Benítez-Ahrendts, M. R. 2011.** *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee- gut, exhibited a beneficial effect on honeybess colonies. *Benef Microbes* 2:29-34.
- Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F., Widmer, F. 2007.** Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol* 59:600–610.
- Bailey L, Ball BV. 1991.** Honey Bee Pathology. London: Academic Press. 193p.
- Bamrick, J.F., Rothenbuhler, W.C. 1961.** Resistance to American foulbrood in honeybees. IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and a susceptible line. *J Insect Pathol* 3: 381–390.
- Bascompte, J., Jordano, P., Olesen, J. M. 2006.** Asymmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science* 312: 431–433.
- Bogdanov, S. 1997.** Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm Wiss Technol* 30: 748-753.
- Bourgeois, A., Rinderer, T., Beaman, L., Danka, R. 2010.** Genetic detection and cuantification of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in the honey bee. *J Invertebr Pathol* 103: 53-58.
- Bradbear, N. 2009.** Bees and their role in forest livelihoods. A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. Food and Agricultured Organization of the United Nations, Rome.
- Brodshneider, R., Crailsheim, K. 2010.** Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.
- Butler, È., Alsterfjord, M., Olofsson, T. C., Karlsson, C., Malmstrom, J., Vásquez, A. 2013.** Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiol* 13, 235.
- Cantwell, G.E. 1970.** Standard methods for counting nosema spores. *Am. Bee J.* 110: 222-223.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Gonzalez Peña, A., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335–336.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* 8: 2387-2391.

Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van, Damme J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J Biochem* 187: 381 – 386.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Tempst, P. 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection - inducible in the honeybee (*Apis mellifera*) *J Biol Chem* 268: 7044 – 7054.

Casteels – Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P. 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide – antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures *J Biol Chem* 269: 28569-28575.

Chen, Y.P., Higgins, J.A., Feldlaufer, M.F. 2004. Quantitative analysis of deformed wing virus infection in the honey bee, *Apis mellifera* L. by real-time RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* 71, 436–441.

Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., Pettis, J. S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J Invertebr Pathol* 97: 186-188.

Chen, Y., Evans, J., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M., Pettis, J. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J Invertebr Pathol* 101: 204-209.

Chen, Y.P., Huang, Z.Y. 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* 41: 364–374.

Chioveani, G., Ionescu, D., Mardare, A. 2004. Control of Nosemosis-treatment with protofil. *Apiacta* 39: 31-39.

Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C. 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 159-165.

- Chomel, B. B., Kasten, R.W. 2010.** Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol* 109:743–50
- Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K. E. 2014.** The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One* 9: e95056.
- Cordara, J. J. 2005.** La Historia de la Apicultura en Uruguay (Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de la Empresa), Montevideo, Uruguay.
- Corona, M., Velarde, R., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., Robinson, G. E. 2007.** Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signalling, and queen honey bee longevity. *PNAS* 104: 7128-7133.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser D. M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis, J. S., Lipkin, W. I. 2007.** A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318:283–287.
- Crailsheim, K., Riessberger-Galle, U. 2001.** Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* 32: 91–103.
- Cremer, S., Armitage, S., Schmid – Hempel, S. 2007.** Social Immunity. *Curr Biol* 17: 693–702.
- Cremer, S., Sixt, M. 2009.** Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci* 364:129–142.
- de Miranda, J. R., Cordoni, G., Budge, G. 2010.** The acute bee paralysis virus Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* 103: 30-47.
- Decourtye, A., Mader, E., Desneux, N. 2010.** Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie* 41: 264-277.
- De Jong, D., De Jong, P.H., Gonçalves, L.S. 1982.** Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*. *J Apicult Res* 21: 165–216.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., Huang, M.H. 2010.** The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera L.*). *J Insect Physiol* 56:1184-1191.
- DeGrandi-Hoffman, G., Corby-Harris, V., DeJong, E. W., Chambers, M., Hidalgo, G. 2016.** Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. *Apidologie* 1-13. 10.1007/s13592-016-0478-y.
- Denman, S. E., McSweeney, C. S. 2006.** Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol.* 58:572–582.

- Dietemann, V., Ellis, J D., Neumann, P (EDS). 2013.** The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. International Bee Research Association; Cardiff, UK. 636 pp. ISBN 978-0-86098-274-6.
- Dietemann, V., Ellis, J D., Neumann, P (EDS). 2013.** The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. International Bee Research Association; Cardiff, UK. 356 pp. ISBN 978-0-86098-275-3.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suachail, 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(8): e72016.
- Doner, L. W. 1977.** The sugars of honey – a review. J Sci Food Agr 28: 443–456.
- Duay, P., de Jong, D., Engels, W. 2002.** Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. Genet Mol Res 1: 227–232.
- Duay, P., de Jong, D., Engels, W. 2003.** Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. Apidologie 34: 61–65.
- Edgar, R. C. 2010.** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26: 2460–2461.
- Engel, P., James, R., Koga, R., Kwong, W. K., Mcfrederick, Q., Moran, N. A. 2013.** Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK. Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *J. Apicult. Res.* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.07>
- Evans, J., Lopez, D. 2004.** Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) J Econ Entomol 97:752–756.
- Evans, J. D., Armstrong, T. N. 2006.** Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. BMC Ecology. 6:4.
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., Hultmark, D. 2006.** Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. Insect Mol Biol 15: 645 – 656.
- Evans, J. D., Spivak, M. 2010.** Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. J Invertebr Pathol 103: S62-S72.
- Engel, P., Martinson, V. G., Moran, N. A. 2012.** Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *P Natl Acad Sci USA.* 109:11002–11007.
- Faegri, K., Iversen, J. 1975.** Textbook of modern pollen analysis. Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
- Faucon, J.P. 2005.** La nose-mose. La sante de l'abeille. 209: 343–367.

- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martin-Hernandez, R., Aguila, C. 2009.** High level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl Environ Microbiol* 75: 6886–6889.
- Fontaine, C., Dajoz, I., Meriguet, J., Loreau, M. 2006.** Functional Diversity of Plant–Pollinator Interaction Webs Enhances the Persistence of Plant Communities. *PLoS Biol* 4: 129–135.
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A., Fries, I. 2009.** Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41: 99–108.
- Forsgren, E., Fries, I. 2010.** Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol* 170: 212–217.
- Fries, I. 1993.** *Nosema apis* a parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74: 5–19.
- Fries, I. 1997.** Protozoa. In: Morse, R. A. (Ed), *Honeybees Pests, Predators and Diseases*, 3rd ed. A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, pp. 57–76.
- Fries, I., Freng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B., Pieniazek, N. K. 1996.** *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). *E J Protist* 32: 356–365.
- Fries, I. 2010.** *Nosema ceranae* in European honey bee (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 103: S73–S79.
- Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A., Rosenkranz, P. 2003.** Swarming in honeybees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie* 34: 389–398.
- Genersch, E. 2010.** American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 103: S10–S19.
- Genersch, E., Aubert, M. 2010.** Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res* 6: 41–54.
- Gerardo, N. M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S. M., de Vos, M., Duncan, E. J., Evans, J. D., Gabaldón, T., Ghanim, M., Heddi, A., Kaloshian, I., Latorre, A., Moya, A., Nakabachi, A., Parker, B. J., Pérez-Brocal, V., Pignatelli, M., Rahbé, Y., Ramsey, J. S., Spragg, C. J., Tamames, J., Tamarit, D., Tamborindeguy, C., Vincent-Monegat, C., Vilcinskis, A. 2010.** Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biology* 11:R21.
- Gilliam, M. 1997.** Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol, letters* 155: 1–10.
- Gilliam, M., Taber, III S., Lorenz B.J., Prest, D.B. 1988.** Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascospaera apis*. *J Invert Pathol* 52: 314–325.

- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E., L. 2015.** Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 349:1255-957.
- Graczyk, T. K., Sunderland, D., Tamang, L., Lucy, F. E., Breysse, P. N. 2007.** Bather density and levels of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. *Parasitol Res* 101:1729–1731.
- Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N. 2011.** Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *J App Entomol* 7: 524–33.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001.** PAST: paleontological statistics.
- Haydak, M. H. 1970.** Honey bee nutrition. *Ann Rev Entomol* 15: 143-156.
- Herbert, E. W., Shimanuki, H. 1978.** Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee stored pollen. *Apidologie* 9: 31–40.
- Herbert, E. W. J. 1992.** Honey bee nutrition. In Graham, J E (ed.) *The hive and the honey bee*. Dadant & Sons Inc.; Hamilton, IL, USA; pp. 197–233.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. M. 1997.** Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* 63:233-3241.
- Higes, M., Martín, R., Meana, A. 2006.** *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92: 93–95.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martín-Hernandez, R., Meana, A. 2007.** Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol* 94: 2011-217.
- Highfield, A. C., El Nagar, A., Mackinder, L. C. M., Noel, L. M-L. J., Hall, M. J., Martin, S. J., Schoroeder, D. C. 2009.** Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *App Env Microbiol* 75: 7212-7220.
- Hoffmann, J. A. 2003.** The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426: 33-38.
- Hornitzky, M. 2008.** *Nosema* Disease. RIRDC Publication No 08/006. RIRDC Project No DAN-228a.
- Huang, W.F., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H., 2005.** Complete rRNA sequence of the *Nosema ceranae* from honeybee (*Apis mellifera*). <https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/F90632004a.pdf> (Date: 2005-11-25).
- Hubert, J., Erbaan, T., Kamler, M., Kopecky, J., Nesvorna, M., Hejdankova, S., Titera, D., Tyl, J., Zurek, L. 2015.** Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. *J App Microbio* DOI: 10.1111/jam.12899.
- Hubert, J., Bicianova, M., Ledvinka, O., Kamler, M., Lester, P. J., Nesvorna, M., Kopecky, J., Erban, T. 2016.** Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microb Ecol*: 1-14. 10.1007/s00248-016-0869-7.

- Hultmark, D. 2003.** Drosophila immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 15:12-19.
- Human, H., Nicolson, S. W. 2006.** Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67:1486–1492.
- Imler, J., Bulet, P. 2005.** Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Mech epithelial defense* 86: 1-21.
- 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. *J Invertebr Pathol* 101: 150 – 153.
- Invernizzi, C., Santos, E., Garcia, E., Daners, G., Di Lando, R., Shadoun, A., Cabrera, C. 2011.** Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations in Uruguay. *Archivos Zootecnia* 60: 1303-1314.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., Allsopp, M. H. 2003.** Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *J Invertebr Pathol* 84:96 –103.
- Judd, T. M. 2011.** The role of food storage and communication in the evolution of perennial social Hymenopteran colonies. In: *Social insects: Structure, Function and Behavior* (ed. Stewart EM), pp. 1–24. Nova, Hauppauge, New York.
- Kacaniova, M., Chlebo, R., Kopernicky, M., Trakovicka, A. 2004.** Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol* 49:169-171.
- Kaltenpoth, M., Engl, T. 2014.** Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Funct Ecol* 28: 315–327.
- Keller I, Fluri P, Imdorf A. 2005.** Pollen nutrition and colony development in honey bees, Part II. *Bee World* 86: 27-34.
- Kešnerová, L., Moritz, R., Engel, P. 2016.** *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 414–421.
- Killer, J., Dubná, S., Sedláček, I. & Svec, P. 2014.** *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int. J Syst Evol Microbiol* 64:152–157.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. J. 2007.** Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 96: 1-10.
- Klein, M. A., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Tscharntke, T. 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B* 274: 303–313.
- Koch, H., Schmid-Hempel, P. 2011.** Socially transmitted gut comunidad microbiana protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc. Natl Acad. Sci* 48:19288-19292.

- Kopecky, J., Nesvorna, M., Hubert, J. 2014.** Bartonella-like bacteria carried by domestic mite species. *Exp Appl Acarol* 64: 21-32.
- Kwong, W. K., Moran, N. A. 2016.** Gut microbial communities of social bees. *Nature Rev Microbiol* 14: 374-384.
- Lan, Y., Wang, Q., Cole, J. R., Rosen, G. L. 2012.** Using the RDP classifier to predict taxonomic novelty and reduce the search space for finding novel organisms. *PLoS One* 7: e32491.
- Liu, F., Wang, Q., Dai, P. L., Wu, Y. Y., Song, H. K., Zhou, T. 2008.** Natural stripe of Microsporidia of honey bee in China, *Chinese Bull Entomol* 45: 963-966.
- Loper, G. M., Standifer, L. N., Thompson, M. J., Gilliam, M. 1980.** Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and beebread. I- Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals. *Apidologie* 11: 63-73.
- Louveaux, J., Mauricio, A., Vorwohl, G. 1978.** Methods of melissopalynology. *Bee World* 59 :139 – 157.
- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., Brasesco, C., De Jong, D., Message, D., Teixeira, W. E., Principal, J., Barrios, C., Ruffinengo, S., Rodríguez Da Silva, R., Eguaras, M. 2016.** Honeybee health in South America. *Apidologie* 1-20.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez Salvador, A., Garrido-Bailón, E., Higes, M. 2007.** Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *App Environ Microb* 73: 6331-6338.
- Martínez, J., Leal, G., Conget, P. 2012.** *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol Res* 111: 601-607.
- Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S., Moran, N. A. 2011.** A simple and distinctive comunidad microbiana associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol* 20:619-628.
- Martinson, V. G., Moy, J., Moran, N. A. 2012.** Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *App Environ Microb* 78: 2830-2840.
- Maurizio, A. 1950.** The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honey bee. *Bee World* 31, 9-12.
- Mayack, C. H., Naug, D. 2009.** Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* 100: 185-188.
- Mendoza, Y., Díaz, S., Ramallo, G., Invernizzi, C. 2012.** Incidence of *Nosema ceranae* during Winter in honey bees colonies removed from *Eucalyptus grandis* plantations. *Veterinaria* 48: 13-19.
- Ministerio de Agricultura y Pesca (MGAP). 2010.** Decreto presidencial 14_6_2010-Oxitetraciclina y Fumagilina- Retiro y/o limitación uso en Uruguay. www.mgap.gub.uy.

- Ministerio de Agricultura y Pesca (MGAP). 2015.** Censo anual estadístico agropecuario 2015.
- Mohr, K. I., Tebbe, C. C. 2006.** Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ Microbiol* 8:258-272.
- Mohr, K. I., Tebbe, C. C. 2007.** Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. *Appl Microbiol Biot* 75:573–582
- Moran, N. A., Degnan, P. H., Santos, S. R., Dunber, H. E., Ochman, H. 2005.** The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 102: 16919-1626.
- Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E., Sabree, Z. L. 2012.** Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *PLOS ONE* 7(4): e36393.
- Morse, R.A., Flottum, K. 1997.** Honey bee pests, predators and diseases. Medine, Ohio, A.I. Root Co, 718.
- Morse, R. A., Calderone, N. W. 2000.** The value of honey bees as pollinators of U. S crops in 2000. *Bee Culture* 128:1-15.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *App Environ Microb* 59: 695-700.
- Muyzer, G. 1999.** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Op Microbiol* 2: 317-322.
- Nanetti, A. 2009.** ApiHerb as an alternative product to treat *Nosema* infection. Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceeding-online.
- Naug, D. 2009.** Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol Conserv* 142: 2369-2372
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G.V. 2007.** The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *Plos Biol* 5: 673–677.
- Neumann, P., Carreck, N. L. 2010.** Honey bee colony losses. *J Apic Res* 49:1–6.
- Nicolson, S. W., Human, H. 2008.** Bees get a head start on honey production. *Biol Letters* 4, 299-301.
- Nicolson, S. W. 2011.** Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *Afr Zoology* 46: 197–204.
- Olofsson, T. C., Vasquez, A. 2008.** Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol* 57:356 –363.

- Omholt, S. W., Amdam, G. V. 2004.** Epigenic regulation of aging in honeybee workers. *Sci Aging Knowledge Environ* 26:pe28.
- Page, R. E., Peng, C. Y. 2001.** Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp Gerontol* 36: 695- 711.
- Pain, J., Maugenet, J. 1966.** Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Ann Abeille* 9: 209–236.
- Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S., 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.
- Pernal, S.F., Currie, R.W. 2000.** Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31, 387-409.
- Pfaffl, M.W. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45.
- Potts, S. G., Roberts, S. P. M., Dean, R., Marris, G., Brown, M. A. Jones, H. R., Neumann, P., Settele, J. 2010.** Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J Apicult Res* 49: 15-22.
- Porrini, M. P., Garrido, P. M., Eguaras, M. J. 2013.** Individual feeding of honey bees: modification of the Rinderer technique. *J Apicult Res* 52: 194-195.
- Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., Moran, N. A. 2014.** Routes of Acquisition of the Gut Comunidad microbiana of the Honey Bee *Apis mellifera*. *App Environ Microb* 80, 7378–7387.
- Rada, V., Máchová, M., Huk, J., Marounek, M., Dušková, D. 1997.** Microflora in the honey bee digestive tract, counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie* 28: 357–365.
- Rangberg, A., Diep, D. B., Rudi, K., Amdam, G. V. 2015.** Paratransgenesis: an approach to improve colony health and molecular insight in honey bees (*Apis mellifera*)?. *Integr Comp Biol* 52:89-99.
- Reeson, A. F., Jankovic, T., Kasperm, M. L., Rogers, S., Austin, A. D. 2003.** Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Mol Biol* 12, 85–91.
- Reuter, G. 2001.** The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2: 43-53.
- Rinderer, T.E., Rothenbuhler, W.C., Gochnauer, T.A. 1974.** The influence of pollen on the susceptibility of honey bee larvae to *Bacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 23: 347-350.
- Rinderer, T. E., Elliott, K. D. 1977.** Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*. *J Econ Entomol* 70: 431-433.

- Rodríguez, M., M. Vargas, M. Gerding, H. Navarro., K. Antúnez. 2012.** Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *J Apicult Res* 51:285-287.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. 2010.** Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103: 96-119.
- Santos, E., García, E., Di Landro, R., Daners, G., Saadoun, A., Cabrera C., Invernizzi C. 2005.** Variación de la proteína corporal y presencia del protozooario *Nosema apis* en colonias de abejas melíferas emplazadas en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. VIII Jornadas de Zoología del Uruguay. Montevideo.
- Sarlo, E., Medici, S. K., Braunstien, m., Eguaras, M. 2008.** Presencia y distribución de *Nosema ceranae* en la región sudeste de la Provincia de Buenos Aires. In: Actas del Segundo Congreso Argentino de Apicultura, Mar del Plata, Argentina, Agosto 2008, p. 26.
- Servin, A. L. 2004.** Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 405–440.
- Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W., Stanley, D. W., Tautz, J. 2008.** Adult honey bees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J Insect Physiol* 54: 439-444.
- Schmidt, J.O., Thoenes, S.C., Levin, M.D. 1987.** Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *J Econ Entomol* 80: 176-183.
- Schmid-Hempel. 1998.** Parasites in Social Insects. Princeton University Press, Princeton, NJ
- Seehuus, S. C., Krekling, T., Amdam, G. V. 2006.** Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. *Exp Gerontol* 41:1117-1125.
- Simone-Finstrom, M., Foo, B., Tarpy, D. R., & Starks, P. T. 2014.** Impact of food availability, pathogen exposure, and genetic diversity on thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Behav* 27: 527-539.
- Somerville, D. 2000.** Honey bee nutrition and supplementary feeding. South Wales: Agriculture.1-8. <http://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets/pdf_file/0008/117494/honey-bee-nutrition-supplementary-feeding.pdf>.
- Somerville, D. 2005.** Fat bees skinny bees – A manual on honey bee nutrition for beekeepers. RIRDC publication 05/054, Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, Australia.
- Stace, P., White, E. 1994.** The use of isoleucine as a supplement feed for honey bees (*Apis mellifera*) in Australia. *Australasian Beekeeper* 96: 159–161.
- Standifer, L.N. 1967.** A comparison of the protein quality of pollens for growth stimulation of the hypopharyngeal glands and longevity of honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Insects Soc* 14, 415-426.

- Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C., Kaltenpoth, M. 2012.** Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut comunidad microbiana in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Mol Ecol* 21: 6134-6151.
- Vásquez, A., Olofsson, T. C. 2009.** The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J Apicult Res* 48:189–195.
- Vásquez, A., Olofsson, T. C. 2015.** The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J Apicult Res and Bee World* 48: 189-195.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T. C. 2012.** Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One* 7, e33188.
- Ventura, M., O'Flaherty, S., Claesson, M. J., Turrone, F., Klaenhammer, T. R., Van Sinderen, D., O'Toole, P. W. 2009.** Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nat Rev Microbiol* 7: 61–71.
- Wahl, O., Ulm, K. 1983.** Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia* 59:106-128.
- Webster, T., Pomper, K., Hunt, G., Thacker, E., Jones, S. 2004.** *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie* 35: 49-54.
- Wilson-Rich N., Dres S. T., Starks P. T. 2008.** The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* 54: 1392–1399.
- Winston, M., L. 1987.** *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press. Cambridge MA.
- Yang, X., Cox-Foster, D. L. 2005.** Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *P Natl Acad Sci USA* 102: 7470-7475.
- Yoshiyama, M., Kimura, K. 2009.** Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *J Invertebr Pathol* 102: 91-96.
- Zander, E. 1909.** Tierische Parasiten als krankheitserreger bei der Biene. *Munchener Bienenzeitung* 31: 196-204.
- Zhou, J., Bruns, M. A., Tiedje, J. M. 1996.** DNA recovery from soils of diverse composition. *App Environ Microb* 62: 316-322.