



Rol de la nutrición de la abeja *Apis mellifera* en la infección con los patógenos de mayor importancia apícola

Mag. María Belén Branchiccela Correa

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay.

2020

Rol de la nutrición de la abeja *Apis mellifera* en la infección con los patógenos de mayor importancia apícola

Mag. María Belén Branchiccela Correa

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Doctora en Ciencias Biológicas en el marco del Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas de la Universidad de la República.

Directora: Dra. Karina Antúnez Claustre

Co-directores: Dr. Ciro Invernizzi y Dr. Pablo Zunino

Montevideo, Uruguay.

2020

Agradecimientos

Gracias a todos quienes permitieron que la realización de esta tesis fuera posible.

A PEDECIBA, a la ANII, la CSIC, y la CAP, por haberme permitido realizar este posgrado y haber financiado los distintos proyectos asociados al mismo.

A mis tutores. A Karina por guiarme en todo este proceso; por transmitirme la pasión por la ciencia y las abejas, por estar a cualquier hora y cualquier día para discutir temas laborales y personales, por impulsarme a seguir y motivar todo lo que planteo. Gracias también por motivar a que tomara otros rumbos laborales, pese a que en el fondo preferías que siguiera trabajando contigo. En definitiva, eso solo refleja tu calidez humana. Gracias por todos estos años de amistad, experiencias y viajes, que después de todo es lo que más importa, lo que perdura en el tiempo y en nuestra memoria. También gracias a Ciro, por haber estado tan presente en toda esta etapa, enseñándome a analizar las cosas desde otro ángulo. Gracias por tantas horas de mate y viajes a Rivera desacomodando mucho la dinámica familiar (y gracias a Lucía por el aguante...), por la diversidad de temas conversados y el esfuerzo físico que significaban algunas actividades. Perdón por dormirme al amanecer y atardecer, es más fuerte que yo. Y también, gracias por esa amistad que se ha ido generando en el tiempo y que seguro perdurará. Por último, gracias a Pablo, por tener siempre esas palabras justas y centradas, obligándonos a no perder el foco. Gracias por todos estos años acompañándome y guiando este proceso de formación profesional y humana.

También a toda la colonia. En especial gracias a Sofi y a Gaby por tantas discusiones diversas, por haberme ayudado a resolver y a analizar algunas cuestiones. Gracias por todos estos años de amistad. Gracias también a Lore y Anita, por estar ahí siempre.

Gracias a Estela, Yamandú, Cristina, Carlitos, Ceci, Sebastián, Gustavo y a todos los productores que participaron en distintas instancias de la tesis (Nestor Viera, Rodrigo Méndez, Eduardo Porley, Felipe Marín). Gracias por la buena energía, tantas horas de trabajo de campo, chistes y risas en el campo armonizando el arduo día de trabajo y por los aportes a las discusiones.

Gracias a Miguel Corona, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y haber promovido la realización de todo lo que le planteaba, y más. Gracias también a todo el grupo del Bee Lab del USDA.

Gracias a mi familia y en especial a mis padres. Porque ustedes fueron quienes sentaron las bases de todos aquellos factores personales que permitieron que yo pudiera ir avanzando y terminando capítulos. Gracias por su apoyo incondicional y estar allí siempre.

Gracias a Diego, por ir acompañando todos estos procesos y la confianza absoluta. Y gracias a Milo por darme el sacudón final.

Muchas gracias!
Belén

Tabla de contenido

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT.....	9
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. Las abejas <i>Apis mellifera</i>	11
3.1.1. Importancia de las abejas <i>A. mellifera</i>	11
3.1.2. Situación actual de la apicultura.....	12
3.2. Pérdidas de colonias de las abejas melíferas.....	14
3.3. Nutrición de las abejas melífera.....	15
3.3.1. Composición del polen.....	16
3.3.2. Digestión.....	17
3.3.3. Fisiología molecular de la digestión.....	18
3.3.4. Requerimientos nutricionales.....	20
3.3.5. Mecanismos de regulación nutricional a nivel colonial	22
3.3.6. Desnutrición y estrés nutricional.....	23
3.3.7. Alimentación artificial de las colmenas.....	24
3.4. Principales plagas y patógenos que afectan a las abejas <i>A. mellifera</i>	25
3.4.1. Varroa destructor.....	26
3.4.2. Virus.....	29
3.4.3. Nosema spp.....	32
3.5. Sistema inmune de las abejas melífera	37
3.5.1. Inmunidad social.....	37
3.5.2. Inmunidad individual	39
3.6. Microbiota intestinal de las abejas melíferas	41
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	44
4.1. Hipótesis.....	44
4.2. Objetivo general.....	44
4.3. Objetivos específicos.....	44
5. CAPÍTULO 1- Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas y en la infección con <i>Nosema ceranae</i> y el DWV.....	46
5.1. Introducción.....	46
5.2. Estrategia experimental.....	48
5.3. Metodología	49

5.3.1. Dietas utilizadas	49
5.3.2. Ensayo 1: Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas	52
5.3.3. Ensayo 2: Efecto de la nutrición en la fisiología e infección con <i>Nosema ceranae</i> y el <i>Virus de alas deformes</i>	53
5.3.4. Purificación de esporas de <i>Nosema spp.</i>	55
5.3.5. Extracción de ADN y PCR para la identificación de <i>Nosema spp.</i>	56
5.3.6. Infección de abejas con <i>Nosema ceranae</i>	57
5.3.7. Procesamiento de muestras, extracción de ARN, síntesis de ADNc y extracción de ADN.....	57
5.3.8. Análisis estadísticos.....	61
5.4. Resultados	63
5.4.1. Dietas utilizadas en los ensayos.....	63
5.4.2. Ensayo 1: Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas y en los niveles de infección con el DWV.....	68
5.4.3. Ensayo 2: Efecto de la nutrición en la fisiología e infección con <i>Nosema ceranae</i> y el <i>Virus de alas deformes</i>	77
5.4.3.1. Esporas de <i>Nosema spp.</i> utilizadas para los ensayos de infección	77
5.4.3.2. Supervivencia diaria.....	77
5.4.3.3. Peso diario de las abejas	79
5.4.3.4. Nivel de expresión de genes vinculados al estado nutricional y al comportamiento.....	80
5.4.3.6. Nivel de infección con DWV	89
5.5- Discusión	92
6. CAPÍTULO 2- Efecto de la microbiota intestinal y la interacción con abejas nodrizas en la alimentación con polen	101
6.1. Introducción.....	101
6.2. Estrategia experimental.....	103
6.3. Metodología	104
6.3.1. Dieta utilizada	104
6.3.2. Ensayo 1: Efecto de las abejas nodrizas en la supervivencia de abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico	104
6.3.4. Extracción de ARN de abejas.....	107
6.3.5. Análisis de la expresión génica.....	108
6.3.6. Extracción de ADN de la comunidad microbiana intestinal de las abejas.....	109
6.3.7. Análisis de la comunidad microbiana intestinal de las abejas.....	110
6.3.8. Análisis estadísticos.....	110
6.4. Resultados	112

6.4.1. <i>Ensayo 1: Efecto de las abejas nodrizas en la supervivencia de abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico</i>	112
6.4.2. <i>Ensayo 2: Efecto de la microbiota intestinal y de las abejas nodrizas en abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico</i>	113
6.5. Discusión	122
7. CAPÍTULO 3- Efecto del estrés nutricional en el estado sanitario, fortaleza y productividad de colonias de abejas melíferas	126
7.1. Introducción	126
7.2. Estrategia experimental	128
7.3. Metodología	129
7.3.1. <i>Ensayo 1: Impacto del estrés nutricional en la fortaleza, salud y productividad de colonias de abejas melíferas. Estrategia experimental</i>	129
7.3.2. <i>Ensayo 2: Impacto de la suplementación invernal con polen en colonias que estuvieron sometidas a estrés nutricional. Estrategia experimental</i>	133
7.3.3. <i>Colonias utilizadas en los ensayos</i>	134
7.3.4. <i>Torta de polen polifloral</i>	134
7.3.5. <i>Fortaleza de las colonias</i>	135
7.3.6. <i>Análisis de Nosema spp.</i>	136
7.3.7. <i>Nivel de infección con virus ARN a nivel colonial</i>	137
7.3.8. <i>Nivel de infección con V. destructor</i>	138
7.3.9. <i>Análisis estadísticos</i>	139
7.4. Resultados	141
7.4.1. <i>Torta de polen polifloral</i>	141
7.4.2. <i>Ensayo 1: Impacto del estrés nutricional en la fortaleza, salud y productividad de colonias de abejas melíferas</i>	141
7.4.3. <i>Ensayo 2: Impacto de la suplementación invernal con polen en colonias que estuvieron sometidas a estrés nutricional</i>	155
7.5- Discusión	161
8. CONSIDERACIONES FINALES	170
9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	174
9.1. Conclusiones	174
9.2. Perspectivas	176
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
11. APÉNDICE 1	202
12. APÉNDICE 2	205

1. RESUMEN

Durante los últimos años se han reportado altos porcentajes de pérdidas de colmenas de abejas *Apis mellifera*. Entre los principales factores que podrían explicar la mortandad de las colmenas, se encuentran la desnutrición de las abejas, asociada al aumento en la extensión de plantaciones de monocultivos, así como el deterioro del estado sanitario de las abejas. En este sentido, los monocultivos proveen a las abejas con polen de un único origen botánico y en un tiempo acotado, lo cual no necesariamente suministra los requerimientos nutricionales que las abejas precisan. Además, las abejas son blanco para la infección de múltiples plagas y patógenos. La hipótesis de esta tesis consiste en que el estrés nutricional de las abejas afecta su fisiología, y consecuentemente su estado sanitario y longevidad. Dichos efectos a nivel individual impactan en la fortaleza, sanidad y supervivencia colonial.

En el primer capítulo se evaluó el efecto de la alimentación con distintas dietas de forma independiente y en interacción con el patógeno *Nosema ceranae* en la supervivencia de las abejas, la expresión de genes vinculados a su estado nutricional, comportamental e inmunológico. Se comprobó que el estrés nutricional extremo (alimentación con jarabe y sin fuente de proteínas) afecta la supervivencia de las abejas y los niveles de expresión de genes asociados al estado nutricional y comportamental. No se observaron diferencias en estos parámetros en las abejas alimentadas con distintos pólenes monoflorales. La expresión de los genes vinculados al sistema inmune varió dependiendo de la dieta, del gen y de la infección con *N. ceranae*, destacándose que: i) la alimentación con polen monofloral de *Eucalyptus grandis* disminuyó el nivel de expresión de genes asociados a la respuesta inmune humoral en comparación a abejas alimentadas con jarabe, ii) el consumo de polen aumentó la expresión del gen de la profenol oxidasa (ppo) por sí mismo y en interacción con *N. ceranae*, enzima involucrada en la respuesta inmune celular, y iii) la infección con *N. ceranae* aumentó el nivel de expresión del gen que codifica para el péptido antibacteriano himenoptecina (him), independientemente de la dieta. Sin embargo, esto no fue suficiente para contener la infección con el microsporidio. Por otro lado, las abejas alimentadas con polen sobrevivieron más que las sometidas a estrés nutricional extremo, aunque presentaron mayores niveles de infección con *N. ceranae*. Esto indica que las consecuencias negativas de dicha infección son controladas por abejas bien nutridas. Por último, se comprobó una interacción negativa entre *N. ceranae* y el Virus de alas deformes.

Teniendo en cuenta que uno de los pólenes poliflorales utilizado en el primer ensayo de la tesis resultó tóxico para las abejas en su primera etapa de vida, en el segundo capítulo de la tesis se profundizó en este aspecto. Se encontró que la interacción con abejas nodrizas o la suplementación con microbiota intestinal de dichas abejas mejora la supervivencia de las abejas recién emergidas. Las abejas acompañadas por nodrizas presentaron mayor abundancia de *Lactobacillus apis* y *Bifidobacterium asteroides*, bacterias características de la comunidad microbiana intestinal de la abeja y con potencial benéfico. Esto podría explicar la mayor supervivencia observada.

En el tercer capítulo se analizó a nivel de campo el efecto del estrés nutricional en la fortaleza y estado sanitario de las colmenas. Dicho estrés nutricional (consumo casi exclusivo de polen *de E. grandis*) disminuyó la población de abejas adultas y de cría, y aumentó los niveles de infección con *N. ceranae*. Por último, se evaluó la suplementación con polen polifloral durante el invierno como estrategia para mitigar los efectos negativos asociados al estrés nutricional, no comprobándose efectos positivos en la fortaleza y sanidad de las colonias. Los resultados hallados demuestran que el estrés nutricional genera un fuerte impacto en la fortaleza y sanidad de las colonias, el cual no es fácilmente reversible.

Esta tesis contribuye a la comprensión de los efectos del estrés nutricional en la fisiología y salud de las abejas melíferas a nivel individual. Además, constituye el primer trabajo que prueba, en condiciones de campo, el impacto del estrés nutricional en la salud de las colonias de abejas melíferas.

2. ABSTRACT

During last years, high percentages of colony losses of honeybees *Apis mellifera* have been reported worldwide. Nutritional stress of the honeybees due to the high extensions of monocrops and their sanitary status are among the main factors associated to these losses. Monocrops provides pollen of a single botanical origin and in a short period of time. Therefore, it does not necessary accomplish all the nutritional requirements that bees need. In addition, honeybees are infected by multiple pest and pathogens. The hypothesis of this thesis is that nutritional stress affects bees physiology, its longevity and sanitary status. These effects at individual level impacts colony strength, health and survival.

In the first chapter, we analyzed the effect of different diets independently or in interaction with the infection of the pathogen *Nosema ceranae* in honeybees survival, and in the expression level of genes related with their nutritional and behavioral status and with its immune response. The extreme nutritional stress (bees fed with only sugar syrup and no proteins) affects bees survival and the expression level of genes related with the nutritional and behavioral status. No differences were observed in bees fed with different monofloral diets. The expression level of immune related genes varied according with the diet, the gen and the infection with *N. ceranae*. The main immune results were that i) feeding with monofloral pollen of *Eucalyptus grandis* decreased the expression level of genes related with the humoral immune response in comparison with bees fed with sugar syrup, ii) the consumption of pollen increased the expression level of prophenol oxidase (involved in the cellular immune response) alone and in interaction with the infection with *N. ceranae*, and iii) *N. ceranae* infection increased the expression level of the gene codifying to the antimicrobial peptide himenoptaecin, independently of the diet. However, these levels were not enough to stop the microsporidia replication, suggesting that the diet affects the expression of genes relates with the immune response of the bees, while the infection of *N. ceranae* affects mainly the cellular immune response. On the other hand, bees fed with pollen survived more than those under extreme nutritional stress but show higher levels of *N. ceranae*. These results suggest that the negative consequences of the infection are controlled in well-nourished bees. Finally, the negative interaction between *N. ceranae* and the Deformed wing virus was corroborated.

Considering that one of the polyfloral pollen used in the first chapter of this thesis was toxic for newly emerged bees in the first period of their lives, in the second chapter we analyzed the possible reasons of this results. The interaction with nurse bees or the supplementation with the gut microbiota of nurse bees improve the survival of newly emerged bees. Bees accompanied with nurse bees showed higher abundance of *Lactobacillus apis* and *Bifidobacterium asteroides*, members of the microbial gut core of the bees and with beneficial properties. This result could explain the higher survival of the newly emerged bees.

In the third chapter, we analyzed the effect of the nutritional stress in colony strength and health. Nutritional stress (consumption of *E. grandis* monofloral pollen) decreased adult and brood population and increased the infection levels of *N. ceranae*. Finally, we analyzed the effect of pollen supplementation during winter as a strategy for decreased the negative effects associated with nutritional stress. There was no positive effect of this strategy in colony strength and health, suggesting that it is difficult to reverse the negative effect of nutritional stress in colony strength and health.

This thesis contributes to the understanding of the effect of nutritional stress in bee physiology and bee health at the individual level. In addition, this is the first study that prove, under field conditions, the impact of nutritional stress in honeybee colony health.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Las abejas *Apis mellifera*

Las abejas melíferas *Apis mellifera* Linnaeus (1758) pertenecen al orden Himenoptera, familia Apidae, dentro de la cual se encuentra el género *Apis*. Las cuatro especies principales son *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea* y *A. mellifera* (Ruttner, 1988), siendo esta última la especie más conocida a nivel mundial, debido a que tiene la capacidad de producir y almacenar grandes cantidades de miel. Estas especies de abejas se caracterizan por ser sociales. La vida en sociedad es uno de los saltos evolutivos más importantes, y la división de tareas ha jugado un rol determinante en el éxito ecológico de estas especies (Wilson, 1971; Szathmáry & Smith, 1995). Esta organización social tiene dos niveles de división de tareas: el primero es estrictamente reproductivo y se caracteriza por la presencia de una reina fértil y múltiples obreras estériles (Szathmáry & Smith, 1995). El segundo nivel está relacionado a la edad y se caracteriza por una transición temporal basada en el trabajo de obreras jóvenes dentro del nido como limpieza, alimentación y cuidado de la cría, y una transición a tareas fuera del nido a medida que las abejas envejecen, realizando actividades de defensa de la colonia y acopio de alimentos (Szathmáry & Smith, 1995).

3.1.1. Importancia de las abejas *A. mellifera*

La polinización por insectos es una función clave en el mantenimiento de los ecosistemas naturales y en la producción de cultivos comerciales (Klein *et al.*, 2007; Potts *et al.*, 2016; Jankielsohn, 2018), estimándose su valor económico en € 153 billones en 2005 (Gallai *et al.*, 2009). En particular, la abeja *A. mellifera* es el principal insecto polinizador (McGregor, 1976), siendo responsable de la polinización del 90% de las plantas dependientes de la polinización animal (Klein *et al.*, 2007; Potts *et al.*, 2016). La alta eficacia como insectos polinizadores radica en la alta densidad de individuos por colonia determinando una gran cantidad de abejas en el campo, así como en las características de su actividad de pecoreo, ya que cada abeja realiza hasta 20 viajes diarios, visitando entre 200 y 600 flores en cada viaje y visita la misma especie floral en cada viaje. En Uruguay, el valor económico de la polinización atribuido a la abeja *A. mellifera* se estimó en 80 millones de dólares anuales, considerando los cultivos de

ciruelo, durazno, frutilla, girasol, manzana, membrillo, pera, tomate, zapallo kabutiá, zapallitos y otros zapallos (Santos *et al.*, 2009). En Estados Unidos, este valor fue calculado en 14,6 billones de dólares en el 2000, considerando la productividad de los principales cultivos de este país (Morse & Calderone, 2000).

Además de su importancia como agente polinizador, la explotación de las abejas melíferas permite obtener una amplia variedad de productos (Crane, 1990). La miel es el principal de estos productos y el más comercializado. Se trata de una sustancia azucarada producida a partir del néctar secretado por las flores con el fin de atraer a los polinizadores y asegurar la fecundación de la planta. El principal uso de la miel es su consumo como endulzante, pero también es utilizado por sus propiedades salutíferas (Bogdanov *et al.*, 2008). Por otro lado, las abejas son utilizadas también para la obtención del polen. El polen es el gameto masculino de las plantas y constituye una fuente de proteínas y micronutrientes para los organismos que lo consumen (Haydak, 1970; Brodschneider & Crailsheim, 2010). Además, es posible obtener a partir de las colmenas otros productos como el propóleo, jalea real, apitoxina y cera (Crane, 1990).

3.1.2. Situación actual de la apicultura

Las abejas *A. mellifera* son la especie del género *Apis* mayormente explotada con fines comerciales debido a que poseen una forma de vida social, cuyas colonias están formadas por numerosos individuos y consecuentemente tienen gran poder polinizador y gran capacidad de producir miel. Según los últimos reportes (2017), casi 91 millones de colmenas comerciales son explotadas a nivel mundial. El número de colmenas ha aumentado de forma constante desde el año 2000 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019) (Fig. 1). El tipo de apicultura varía en las distintas regiones. Por ejemplo, existen países como Austria cuya apicultura se caracteriza por un gran número de apicultores no profesionales que manejan 15 colmenas como máximo (Bee Austria, 2018), mientras que, en países como Argentina, Estados Unidos y Canadá suelen encontrarse apicultores profesionales manejando más de 300 colmenas. En estos casos, la actividad de estas colmenas es la polinización de cultivos comerciales y la producción de miel para exportación.

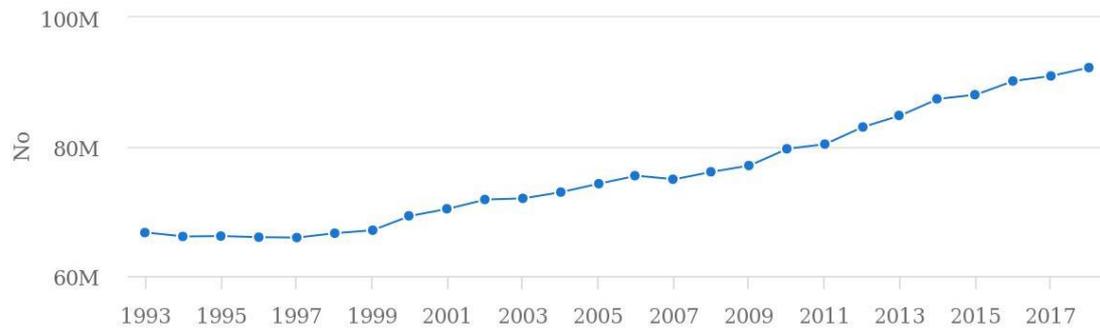


Figura 1. Variación del número de colmenas en el mundo durante los últimos 25 años. Fuente: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019.

En Uruguay, la actividad apícola se basa en la producción de miel. En los últimos cinco años, el número de colmenas se ha mantenido relativamente constante mientras que el número de apicultores ha disminuido (MGAP, 2019) (Fig. 2). El abandono de la actividad de muchos apicultores responde principalmente a la baja rentabilidad actual del negocio debido a bajos precios de comercialización de la miel y altos costos productivos, a lo cual se suman los problemas a los cuales se enfrentan las colonias de abejas, como problemas sanitarios, nutricionales, intoxicación con pesticidas, entre otros (Smith *et al.*, 2013; Steinhauer *et al.*, 2018).

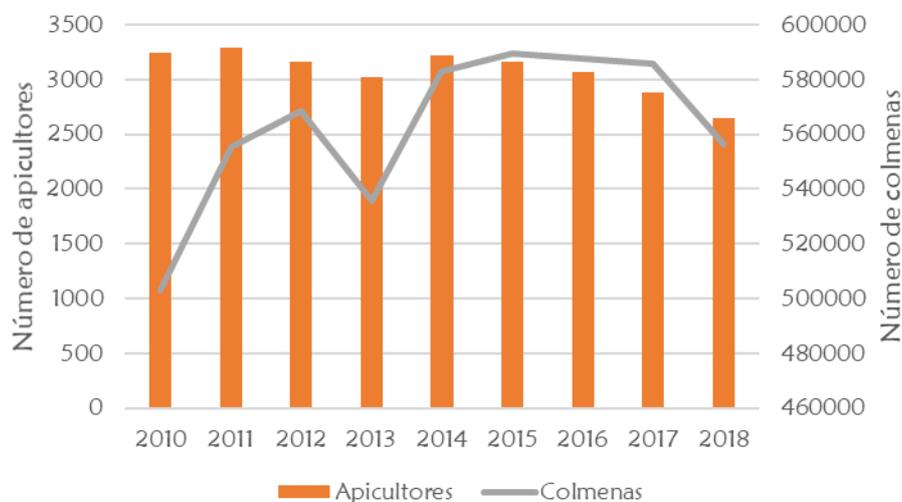


Figura 2. Variación en el número de colmenas y apicultores en Uruguay entre el 2010 a 2018.

Fuente: MGAP, 2019.

3.2. Pérdidas de colonias de las abejas melíferas

Durante los últimos años, se han reportado pérdidas de polinizadores y en particular de colonias de abejas melíferas a nivel mundial (Carreck & Neumann, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Goulson *et al.*, 2015; Brodschneider *et al.*, 2016; Steinhauer *et al.*, 2018). Los porcentajes de pérdidas de colonias varían según el año y país, llegando a valores de hasta el 32,5% de pérdidas invernales en Alemania, o el 27% en Estados Unidos. Estas pérdidas pueden ascender al 45% si se considera las pérdidas anuales (Brodschneider *et al.*, 2016, 2018; Kulhanek *et al.*, 2017; Gray *et al.*, 2019). Se ha planteado que la desnutrición de las abejas asociada al aumento de áreas destinadas a monocultivos, la infección con múltiples plagas y patógenos, la intoxicación con pesticidas, problemas de reina y el cambio climático, constituyen los principales factores asociados a dichas pérdidas (Potts *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2012; Steinhauer *et al.*, 2018). En Latinoamérica se planteó por mucho tiempo la ausencia de pérdidas de colonias a gran escala como las reportadas en el hemisferio norte (Vandame & Palacio, 2010). Sin embargo, estudios recientes han comprobado pérdidas similares, e incluso mayores, en esta región (Requier *et al.*, 2018). En Uruguay, desde el año 2013 se realiza una encuesta a los productores apícolas con el fin de estimar las pérdidas anuales de colonias y los posibles factores asociados. En base a la respuesta de cerca del 3% de los productores (abarcando 25.000 colmenas aproximadamente), e incluyendo el período 2013-2018, se estimó que entre el 20 y 30% de las colonias se pierden anualmente en nuestro país (Antúnez *et al.*, 2016; Requier *et al.*, 2018). Los principales factores identificados por los apicultores como responsables de dichas pérdidas son las fallas vinculadas a las reinas, los problemas sanitarios y la intoxicación con pesticidas. Además, tanto en diferentes países de Europa como en Uruguay, dichas pérdidas se dan de forma independiente a si se trata de apiarios fijos o trashumantes (Antúnez *et al.*, 2016; Brodschneider *et al.*, 2018).

3.3. Nutrición de las abejas melífera

La alimentación de las abejas *A. melífera* se basa en el consumo de miel y polen. La miel es la principal fuente de carbohidratos, siendo los principales glucosa y fructosa (Doner, 1977). La miel se obtiene a partir del néctar colectado por las abejas adultas de las flores, las cuales lo segregan con el fin de atraerlas y asegurar su polinización. Una vez colectado comienza el proceso de maduración del néctar, concentrando los azúcares por evaporación de su contenido de agua y mediante el agregado de enzimas por parte de las abejas como invertasa, diastasa y glucosa oxidasa (Doner, 1977; Nicolson & Human, 2008). Una vez en la colmena, el néctar es depositado en las celdas donde finaliza el proceso de evaporación hasta obtener el porcentaje de humedad final menor al 20% y la celda es cerrada con un opérculo cuya composición impide el intercambio de humedad con el ambiente (Bogdanov, 2009).

Las abejas adultas tienen muy pocas reservas de carbohidratos, proteínas y lípidos. El contenido de carbohidratos es en forma de glicógeno y las reservas en las abejas adultas es muy inferior a la de las larvas (revisado por Hrasnigg and Crailsheim, 2005), estimándose que, en total, las abejas precisan aproximadamente 59,4 mg de carbohidratos para desarrollarse (Rortais *et al.*, 2005).

Por otro lado, el polen es la principal fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales de las abejas (revisado por Brodschneider and Crailsheim, 2010). El polen es colectado por las abejas de las anteras de las flores, es transportado en sus corbículas hasta la colmena y almacenado en las celdas (formando *pellets* de polen). Las características del polen recientemente colectado y del polen ensilado o pan de abeja ("*beebread*") son diferentes: el polen ensilado posee un pH inferior al polen corbicular, difieren en su contenido de carbohidratos y en su composición microbiana (Anderson *et al.*, 2011; revisado en Nicolson, 2011). Por mucho tiempo se planteó que el valor nutricional del polen ensilado era superior al del polen corbicular debido a que dentro de las celdas sufre un proceso de maduración asociado a la digestión microbiana (Gilliam, 1997). Sin embargo, el advenimiento de las técnicas moleculares y el estudio mediante microscopía electrónica de barrido han planteado que la microbiota asociada al polen ensilado tendría funciones de preservación y no de digestión o predigestión del mismo (Anderson *et al.*, 2014). De hecho, el bajo pH, baja actividad de agua, alto potencial de oxidación-reducción y la presencia de microorganismos competidores como bacterias del ácido láctico, son cuatro de las cinco estrategias de conservación

principales utilizadas por los humanos para preservar los alimentos. Además, estos resultados son coherentes con estudios de preferencia de consumo de polen, los cuales han planteado que las abejas prefieren consumir el polen recientemente ensilado (Pernal & Currie, 2000; Carroll *et al.*, 2017).

3.3.1. Composición del polen

Como se mencionó previamente, el polen está compuesto por proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. Se han descrito 10 aminoácidos esenciales para las abejas (histidina, arginina, treonina, valina, metionina, leucina, isoleucina, fenilalanina, lisina y triptófano) cuya ingesta puede ser asegurada únicamente por el consumo del polen (de Groot, 1953). Sin embargo, el contenido de proteínas y lípidos, así como su composición específica varía en las distintas especies botánicas (Roulston & Cane, 2000; Somerville, 2001; Somerville & Nicol, 2006), por lo que no necesariamente las distintas especies aseguran los requerimientos nutricionales que las abejas precisan. Se ha planteado que pólenes con un contenido de proteínas menor al 20% no puede satisfacer los requerimientos coloniales (Kleinschmidt & Kondos, 1976). Sin embargo, existe evidencia que el porcentaje de proteína no sería el único indicador a considerar para valorar la calidad nutricional del polen, sino que otros factores como la abundancia relativa de los aminoácidos esenciales y grasas serían también relevantes (Nicolson, 2011; Di Pasquale *et al.*, 2013). En este sentido, el estudio del efecto de los lípidos sobre las abejas no está muy documentado. Se ha reportado que la deficiencia en omega 3 se asocia a problemas de aprendizaje, lo cual repercutiría en la capacidad de pecoreo de las abejas y disminuiría el tamaño de las glándulas hipofaríngeas afectando las funciones de las nodrizas (Arien *et al.*, 2015).

Por otro lado, el polen puede contener compuestos potencialmente tóxicos para las abejas (revisado en Johnson, 2015). Se ha reportado que carbohidratos como manosa, xilosa, arabinosa y galactosa así como el ácido galacturónico presente en las pectinas pueden reducir la supervivencia de las abejas criadas en condiciones de laboratorio (Barker, 1977). Algunos almidones y flavonoides como la quercetina tienen el potencial de interferir en la producción de energía (Dewick, 2002; Hong & Pedersen, 2008). Los alcaloides, son también compuestos potencialmente dañinos para las abejas y se ha reportado que las consecuencias de su consumo son dosis dependiente (Reinhard *et al.*,

2009; Arnold *et al.*, 2014). Por último, hongos principalmente del género *Aspergillus* presentes en el polen ensilado tienen la capacidad de producir alfa y ocratoxinas en condiciones de cultivo, y estas toxinas resultan tóxicas para las abejas recién emergidas luego de 24 horas de consumo (González *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2011). Sin embargo, existe evidencia que el potencial tóxico de todos estos compuestos puede ser revertido en condiciones naturales ya que las micotoxinas podrían ser detoxificadas por la actividad de la citocromo P450 (Niu *et al.*, 2011), a nivel de campo los carbohidratos presentes en el néctar podrían diluir los niveles de los monosacáridos potencialmente tóxicos a niveles inocuos (Barker, 1977), y la microbiota intestinal procesaría compuestos como el ácido galacturómico y pectinas (Engel *et al.*, 2012). Estos antecedentes sugieren una fuerte coevolución entre la planta y el polinizador, permitiéndole a las abejas incorporar los nutrientes necesarios al procesar aquellos que puedan resultar tóxicos e incluso utilizarlos y beneficiarse de su consumo, como es el caso de la quercetina.

3.3.2. Digestión

En las abejas adultas, los carbohidratos consumidos son almacenados en el buche melario y circulan rápidamente hacia el intestino medio. La velocidad de dicha circulación depende en gran medida de la concentración de carbohidratos en la hemolinfa (Crailsheim, 1988c). La absorción de los carbohidratos se da en la primera región del intestino medio mediante difusión simple siendo dicha absorción prácticamente completa (Crailsheim, 1988a; b).

La variación en el consumo de polen a lo largo del ciclo de vida de las abejas es acompañada por cambios fisiológicos asociados a la producción de enzimas con actividad proteolítica y cambios anatómicos vinculados al desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y cuerpos grasos (Moritz & Crailsheim, 1987). El polen ingerido atraviesa el buche, y es comprimido y trasladado al intestino medio. En el intestino medio los granos de polen son retenidos entre las membranas peritróficas, y su contenido es liberado al espacio periplásmico por compresión osmótica y acción de enzimas proteolíticas y microbianas (Kroon *et al.*, 1974; Zheng *et al.*, 2019). La acción de estas enzimas proteolíticas se da principalmente en el lumen y su concentración depende de la edad de las abejas y sus funciones dentro de la colmena (Moritz & Crailsheim, 1987). En el intestino medio se da la absorción de los aminoácidos, la cual es mediada por

transportadores específicos y no precisa aporte energético (Haszonits & Crailsheim, 1990). Se ha reportado que su transporte puede ser inhibido por la presencia de otros aminoácidos como es el caso de la leucina e isoleucina, sugiriendo que algunos aminoácidos poseen transportadores compartidos (Crailsheim, 1988d). Una vez en la hemolinfa, los aminoácidos absorbidos son almacenados en los cuerpos grasos, los cuales constituyen las mayores reservas de proteínas y lípidos de las abejas. La composición de los cuerpos grasos varía a lo largo del año, ya que su contenido de lípidos aumenta en primavera y verano, mientras que la concentración de proteínas disminuye sensiblemente en presencia de cría en las colonias, posiblemente por el mayor consumo de estos compuestos por parte de la cría (Fluri *et al.*, 1982). Dichas proteínas son movilizadas por la hemolinfa y transportadas hacia las glándulas hipofaríngeas y/o excepcionalmente, hacia los ovarios en el caso de las obreras ponedoras de huevos (Amdam & Omholt, 2003). Las glándulas hipofaríngeas utilizan estos compuestos para la síntesis de la jalea real. La jalea real es producida por las abejas nodrizas para alimentar a las larvas, reina, obreras y eventualmente a zánganos mediante trofalaxis (Crailsheim, 1992). De esta forma, la ingesta de proteínas a nivel individual se distribuye a nivel colonial, por lo que su cantidad y calidad repercute en las sucesivas generaciones y en la homeostasis colonial.

3.3.3. Fisiología molecular de la digestión

El transporte de los aminoácidos desde los cuerpos grasos hacia las glándulas hipofaríngeas se da principalmente por la Vitelogenina (Vg) (Amdam *et al.*, 2010). La Vg es una lipoproteína de 180 kDa, es el principal transportador de nutrientes de la hemolinfa y consecuentemente representa la proteína predominante (Fluri *et al.*, 1982; Wheeler & Kawooya, 1990). Además, la Vg es el principal transportador de Zn de la hemolinfa (Amdam *et al.*, 2005; Seehuus *et al.*, 2006) y deficiencias en el contenido de este metal se han relacionado al aumento del estrés oxidativo (Mocchegiani *et al.*, 2000). En abejas obreras de colmenas con reina activa, la Vg se une a receptores específicos en las glándulas hipofaríngeas (Amdam & Omholt, 2002) y promueve la síntesis de jalea real. El consumo de proteínas determina un aumento en los niveles de Vg, cuya concentración está regulada inversamente con los de la hormona juvenil (HJ) de las abejas (Cremonez *et al.*, 1998; Amdam & Omholt, 2003; Guidugli *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008). La HJ es sintetizada a nivel del sistema nervioso central en el

corpora allata y su síntesis está regulada por la metil feresoato epoxidasa (*mfe*) (Helvig *et al.*, 2004; Bomtorin *et al.*, 2014), y se trata de una hormona ampliamente estudiada en insectos debido a que tiene un rol clave en la regulación de la división de tareas (Robinson, 1992; Hartfelder & Engels, 1998; Schulz *et al.*, 2002; Amdam & Omholt, 2003). Dicha regulación mutua entre la Vg y HJ junto con el hecho que i) la nutrición juega un rol importante en la división de tareas ya que la edad de comienzo de pecoreo depende de cambios en el estado nutricional de las abejas y de la expresión de genes vinculados a la nutrición (Ament *et al.*, 2010), y que ii) las abejas nodrizas tienen mayores reservas de lípidos que las pecoreadoras, y la disminución en dichas reservas se asocia a la transición entre ambos comportamientos (Toth, 2005; Toth & Robinson, 2005), permiten proponer que la nutrición juega un rol clave en la regulación de división de tareas y en la longevidad de las abejas (Toth & Robinson, 2005; Corona *et al.*, 2007, 2016; Ament *et al.*, 2010). Los mecanismos moleculares por los cuales el estado nutricional se traduce en cambios comportamentales gobernados por el sistema nervioso central aún no se conocen en detalle. Corona y colaboradores (2007) propusieron un modelo explicando la interacción entre el estado nutricional de las abejas, los niveles de Vg, HJ y la cascada de señalización de la insulina y péptidos tipo insulina (IIS). En dicho modelo, TOR (*target of rapamycin*) jugaría un rol clave actuando como mediador y censando el contenido de aminoácidos y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Egfr) también cumpliría importantes funciones al mediar la interacción entre el IIS y la proteína mayor 1 de la jalea real (Mrjp1) (Kamakura, 2011; Mutti *et al.*, 2011; Corona *et al.*, 2016). La Mrjp1 es la proteína más abundante del total de las proteínas mayores de la jalea real (MRJPs), las cuales son expresadas principalmente en las glándulas hipofaríngeas y consecuentemente tienen un pico de expresión en etapa de abeja nodriza (Schmitzová *et al.*, 1998; Buttstedt *et al.*, 2013). De esta forma, junto con el hecho que la síntesis de la Mrjp1 está regulada por la HJ (Malecová *et al.*, 2003), la Mrjp1 también está asociada a la cascada de señalización de la IIS-Vg-HJ. El modelo propuesto por Corona fue posteriormente respaldado por Ament y colaboradores (2008), quienes destacaron que las conexiones moleculares entre estos efectores claves son complejas y aún resta mucho por dilucidar acerca de las cascadas de señalización asociadas a la regulación nutricional de la transición de tareas.

3.3.4. Requerimientos nutricionales

En las abejas *A. mellifera* los requerimientos nutricionales a nivel individual poseen un fuerte impacto en el desarrollo y comportamiento colonial. Las larvas consumen en promedio 59,4 mg de carbohidratos durante su desarrollo (Rortais *et al.*, 2005) y entre 25 y 37,5 mg de proteína diarios (o 125-187,5 mg de polen), siendo los principales consumidores de proteína de la colmena (revisado por Hrasnigg and Crailsheim, 2005). La forma en que estas proteínas son consumidas varía dependiendo de la edad de las larvas: durante los primeros tres días de vida las larvas son alimentadas con jalea real y posteriormente con una jalea real de color amarillento conteniendo baja concentración de polen (revisado por Haydak, 1970).

Por otro lado, los requerimientos nutricionales de las abejas adultas son 4 mg de azúcares en promedio por día y entre 3,4 y 4,3 mg de polen por día para sobrevivir (Barker and Lehner, 1974; revisado por Hrasnigg and Crailsheim, 2005). Además del consumo de azúcares y polen, se plantea que existe un consumo de jalea real durante toda la vida de la abeja (Crailsheim, 1990a). Durante las primeras 24 horas de vida, las abejas adultas consumen mínimas cantidades de polen, y dicho consumo aumenta sensiblemente teniendo un pico de consumo a los 6 días (Crailsheim *et al.*, 1992). Posteriormente, hacia los 10 días de edad el polen consumido comienza a disminuir (Crailsheim *et al.*, 1992). Dicha variación responde a las actividades de síntesis de jalea real para la alimentación de los otros integrantes de la colmena (durante los primeros 14-20 días de vida en primavera y verano) y a su transición hacia tareas como de seguridad y pecoreo en la última etapa de vida. La variación en el consumo de proteínas también es acompañada por cambios en el consumo de carbohidratos, ya que su consumo aumenta sensiblemente cuando se incrementan los vuelos de pecoreo debido a la necesidad de un mayor aporte energético (Haydak, 1970). Por último, si bien están ampliamente documentados los requerimientos de carbohidratos y proteínas a lo largo del ciclo de vida de las abejas, existe un vacío de información vinculada a la importancia de los lípidos y micronutrientes en estos organismos. Dichos requerimientos de nutrientes a nivel individual determinan, en asociación con la abundancia de organismos dentro de la colonia y reservas de alimento entre otros factores, la actividad de pecoreo y dinámica colonial. Brodschneider y Crailsheim (2010) esquematizaron los tres niveles de nutrición dentro de la colonia (larvas, individuos adultos y la colonia), sus dependencias y los posibles efectos de una malnutrición proteica (Fig. 3). Dichos niveles

están conectados: la actividad de las abejas adultas repercute en la calidad y número de larvas y el estado nutricional de las larvas determinará el estado nutricional de las siguientes generaciones de abejas, cuya actividad repercutirá a su vez en las reservas de alimentos y en la nutrición colonial (Brodschneider & Crailsheim, 2010). De esta forma, los tres niveles nutricionales de la colonia tienen una alta dependencia entre sí, y su interconexión determinará el éxito de la colonia. Esta interconexión está mediada por interacciones entre las abejas adultas entre sí y con la cría. En este aspecto, la trofalaxis juega un rol clave. Se trata del intercambio de alimentos entre individuos dadores y aceptores luego de una serie de comportamientos entre los cuales el contacto entre antenas de ambos es crucial (Free, 1956, 1957; Korst & Velthuis, 1982).

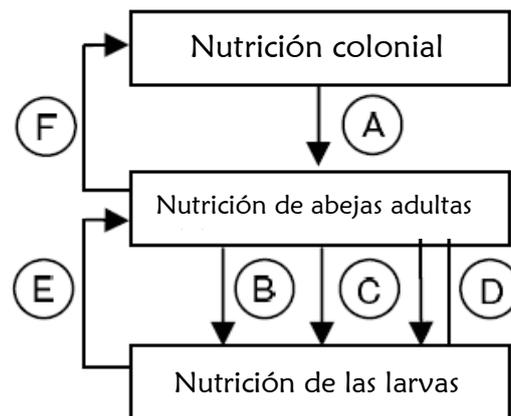


Figura 3. Representación esquemática de los tres niveles de nutrición dentro de la colonia, sus dependencias y los posibles efectos de una malnutrición proteica. A: dependencia de individuos adultos en las reservas de alimento de la colmena; B: inversión en la calidad de las larvas; C: Regulación en el número de larvas; D: Canibalismo; E: impacto de la nutrición de las larvas en las siguientes generaciones; F: impacto de los adultos en la nutrición colonial. Fuente: Brodschneider y Crailsheim (2010) (traducida).

3.3.5. Mecanismos de regulación nutricional a nivel colonial

La colecta de polen está regulada por las necesidades nutricionales de la colonia, entre otros factores (revisado por Brodschneider and Crailsheim, 2010 y por Schmickl and Crailsheim, 2004). El ingreso de polen a la colonia aumenta frente a la falta de polen en la misma y al aumento en el número de larvas (Barker, 1971; Al-Tikrity *et al.*, 1972; Fewell & Winston, 1992; Rotjan *et al.*, 2002), habiendo una correlación positiva entre la cantidad de polen colectado y la cantidad de cría en la colmena (Free & Williams, 1971). De esta forma, la actividad de pecoreo está regulada por la relación entre las reservas y las demandas de polen. Los mecanismos de regulación de esta actividad se dan en tres niveles. Por un lado, se ha propuesto que el flujo de alimentos dentro de la colmena es un mecanismo importante de comunicación entre nodrizas y pecoreadoras, y la trofalaxis juega un papel clave en dicha comunicación: cuando hay una alta relación entre el polen disponible y la cantidad de cría, se da transferencia de alimentos con alto contenido en proteínas mediante trofalaxis entre nodrizas y pecoreadas, inhibiendo la colecta de polen (Camazine, 1993; Camazine *et al.*, 1998). Por otro lado, la cría tiene el potencial de inducir el pecoreo de polen a través de la secreción de una feromona que actúa directamente sobre las abejas pecoreadoras (Pankiw *et al.*, 1998) y, por último, Dreller y Tarpy (2000), propusieron que las abejas pecoreadoras tienen la capacidad de censar de forma directa las necesidades de polen de la colmena mediante la inspección de las celdas conteniendo cría y polen. Por lo tanto, resulta evidente que la regulación de la actividad de pecoreo es compleja, depende de múltiples procesos y posiblemente dichos procesos se complementen de forma de asegurar la homeostasis colonial.

Otro factor que tendría el potencial de influir en la nutrición colonial es la capacidad de las abejas de discriminar el polen según su contenido nutricional y modificar su comportamiento de pecoreo en función de las fuentes de polen disponibles en el ambiente. Se ha reportado que los abejorros del género *Bombus* tienen la capacidad de coleccionar alimentos con alto contenido nutricional (Leonhardt & Bluthgen, 2012) y discriminar el polen en función de su relación entre proteínas y lípidos modificando su comportamiento para coleccionar aquellos con un balance óptimo de estos compuestos (Vaudo *et al.*, 2016). Sin embargo, no existe un consenso acerca de que las abejas melíferas tengan esta capacidad. Corby-Harris y colaboradores (2018) plantearon que las abejas nodrizas deberían tener la capacidad de discriminar el polen en base a su contenido nutricional ya que son los organismos que consumen dicho polen y

determinan su utilización dentro de la colmena. Sin embargo, estos autores no pudieron comprobar esta hipótesis considerando el tamaño de las glándulas hipofaríngeas, la diversidad del polen y la relación proteína-lípidos como parámetros indicativos de la calidad nutricional del polen (Corby-Harris *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha planteado que las abejas pecoreadoras tienen preferencia por pólenes con alto contenido en lípidos, posiblemente debido a que los lípidos tienen propiedades fagoestimulantes (Singh *et al.*, 1999). De esta forma, las abejas pecoreadoras podrían potencialmente censar el contenido particular de aminoácidos esenciales y ácidos grasos, optando por dietas que suministren principalmente aquellos compuestos que la colonia necesita, aunque dicho concepto está en discusión (Zarchin *et al.*, 2017; Hendriksma y Shafir, 2016).

3.3.6. Desnutrición y estrés nutricional

La alimentación con polen y los distintos tipos de pólenes afectan la expectativa de vida de las abejas y consecuentemente en la transición de tareas (Toth, 2005; Ament *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013). Además, se ha planteado que abejas mejor nutridas tienen la capacidad para responder mejor frente a la infección con patógenos, ya que presentan mayor expresión de genes asociados a la respuesta inmune individual humoral y social (Alaux *et al.*, 2010; DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015; Castelli, 2017). También, la alimentación con polen disminuye la sensibilidad de las abejas a la intoxicación con pesticidas, probablemente debido a una mayor activación de genes vinculados a la detoxificación de dichos compuestos (Schmehl *et al.*, 2014). En este marco y teniendo en cuenta el escenario de producción agrícola mundial, resulta evidente que la intensificación en el uso del suelo asociado al aumento de áreas destinadas a monocultivos afecta a las abejas tanto a nivel individual como colonial, proporcionándoles polen de una o unas pocas fuentes mayoritarias (Naug, 2009). Dicha fuente de polen está disponible solo durante el período de floración del cultivo y no necesariamente suministra todos los requerimientos nutricionales que las abejas precisan (De Groot, 1953; Somerville, 2001; Naug, 2009), por lo que la salud de las abejas y su homeostasis colonial resultan vulnerables.

3.3.7. Alimentación artificial de las colmenas

Tradicionalmente las colonias de abejas melíferas son alimentadas por los apicultores con el fin de suministrarles alimentos en épocas que lo requieren ya que las reservas coloniales no son suficientes para cubrir sus necesidades, o para promover un mayor desarrollo colonial y lograr mejores rendimientos productivos. Dicha alimentación puede ser un sustituto o un suplemento nutricional. La diferencia entre ambos es que los suplementos poseen miel o polen como componentes, mientras que los sustitutos están compuestos únicamente por ingredientes externos a los encontrados naturalmente en las colmenas (Haydak, 1970).

Con el fin de proveer a la colmena de carbohidratos, suelen suministrarse distintos sustitutos. El jarabe en base a azúcar de caña es el comúnmente utilizado, pero también suelen suministrarse preparaciones caseras o comerciales conteniendo azúcar de caña invertida y/o impalpable entre otros componentes, y jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS) el cual resulta más económico (Hanover & White, 1993). Si bien se ha reportado que en términos generales la alimentación con HFCS es similar a la alimentación con miel o jarabe de azúcar (Severson & Erickson, 1984; Barker, 2000; Sammataro & Weiss, 2013), los efectos fisiológicos en abejas alimentadas con estas dietas son muy distintos (Wheeler & Robinson, 2014). Abejas alimentadas con miel presentan mayor expresión de genes vinculados al metabolismo de aminoácidos y oxidación-reducción en comparación a abejas alimentadas con HFCS y jarabe de azúcar, demostrando que los constituyentes presentes en la miel regulan de forma diferente los procesos fisiológicos de las abejas y por lo tanto estas tres alimentaciones no serían nutricionalmente equivalentes (Wheeler & Robinson, 2014).

Por otro lado, con el fin de proveer a la colmena con proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, existe una amplia variedad de sustitutos y suplementos nutricionales de preparación tanto casera como comercial (Haydak, 1970). La mayoría de éstos contienen hidrolizados de levaduras y proteínas de origen vegetal, entre otros componentes. Las consecuencias de la administración de estos compuestos pueden resultar positivas, negativas o neutras en comparación a la alimentación basada en polen (Mattila & Otis, 2006; De Jong, 2009; Saffari *et al.*, 2010; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2016). Las diferencias pueden radicar en el tipo de suplemento/sustituto analizado, la variable utilizada para determinar el efecto de los mismos o el diseño experimental. Por lo tanto, teniendo en cuenta la falta de información relacionada a las necesidades

nutricionales de las abejas, la variedad de productos nutricionales disponibles y los resultados obtenidos a partir de estudios comparativos, es posible proponer que no existe actualmente información suficiente que demuestre que la alimentación con polen pueda ser sustituida por una alimentación artificial equivalente.

3.4. Principales plagas y patógenos que afectan a las abejas *A. mellifera*

Si bien la eusocialidad de las abejas melíferas brinda variadas ventajas, al mismo tiempo determina que sean un blanco para la infección de múltiples plagas y patógenos ya que encuentran en las colonias una forma fácil de multiplicarse y propagarse. Consecuentemente, las abejas son infectadas por ácaros internos y externos, virus, hongos, bacterias y otros insectos. Dentro de los ácaros se destaca *Varroa destructor*, *Acarapis woodi* y *Tropilaelaps clareae* (revisado por Eckert, 1961; revisado por Rosenkranz *et al.*, 2010). Considerando las consecuencias de la infección y el impacto a nivel productivo, *V. destructor* es el de mayor relevancia. Por otro lado, se han descrito más de 26 virus que afectan a las abejas melífera, siendo siete los de mayor relevancia apícola (revisado por McMenamin & Flenniken, 2018; Remnant *et al.*, 2017). *Nosema apis*, *Nosema ceranae* y *Nosema neumanii* son tres microsporidios, que junto con *Ascospaera apis* se encuentran entre los patógenos fúngicos que afectan a las abejas *A. mellifera* (Chemurot *et al.*, 2017; Fries, 2015; revisado por Gilliam, 1990; Higes *et al.*, 2006). Por último, las bacterias *Paenibacillus larvae*, agente causal de la enfermedad Loque Americana y *Melissococcus plutonius*, causal de la Loque Europea, son las dos bacterias más relevantes desde el punto de vista sanitario (Genersch, 2010a; b).

A continuación, se describen los aspectos más importantes vinculados a las características biológicas y consecuencias de las enfermedades causadas por los principales patógenos que afectan a las abejas *A. mellifera* (*V. destructor*, los virus de la parálisis aguda, de las celdas reales negras, de las alas deformes y de la cría ensacada, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*), y cuyo estudio fue abordado en esta tesis.

3.4.1. Varroa destructor

Varroa destructor es la principal amenaza sanitaria que afecta a las abejas *A. mellifera* (Carreck *et al.*, 2010; Dainat *et al.*, 2012b; Chauzat *et al.*, 2014). Se trata de un ácaro ectoparásito cuyo hospedero original son las abejas asiáticas *Apis cerana* y saltó de hospedero hacia *A. mellifera* a mediados del siglo pasado (Rosenkranz *et al.*, 2010). Desde entonces, se ha distribuido de forma exitosa en todo el mundo (revisado por Rosenkranz *et al.*, 2010), siendo Australia el último país libre de esta plaga hasta el año 2016 (OIE World Animal Health Information System, 2019).

3.4.1.1. Ciclo de vida

El ciclo reproductivo de *V. destructor* comienza cuando una varroa hembra ingresa a una celda conteniendo una cría de obrera o zángano próxima a opercular (revisado en Rosenkranz *et al.*, 2010). Dicho ácaro es transportado hacia las celdas por las abejas nodrizas, y los factores que determinan el ingreso a este tipo de celdas se asocian a su distancia a las celdas y a la emisión por parte la larva de ésteres de ácidos grasos e hidrocarburos cuticulares que resultan atractivos para el ácaro (Le Conte *et al.*, 1989; Rickli *et al.*, 1994). Luego de 90 horas postoperculado comienza la ovoposición, cuya descendencia puede variar, pero en todos los casos consiste en un primer huevo que dará lugar a un macho y los restantes huevos que darán lugar a hembras (revisado por Nazi and Le Conte, 2016). El ciclo reproductivo de este ácaro resulta exitoso, ya que las hembras descendientes son fecundadas en la propia celda por el macho, por lo que todas las hembras están en condiciones de dejar descendencia una vez colonicen una nueva celda (Donze & Guerin, 1994). Las abejas que emerjan portarán los ácaros hembras y/o la hembra fundadora, las cuales buscarán otra abeja nodriza para poder colonizar una nueva celda y comenzar nuevamente el ciclo reproductivo. Recientemente se planteó que en la etapa en la que el ácaro se encuentra sobre las abejas, se alimenta de sus cuerpos grasos (Ramsey *et al.*, 2019). Este concepto derriba un paradigma vinculado a la alimentación exclusiva de la varroa a partir de la hemolinfa de las abejas, y determina que la tradicionalmente llamada fase forética del ácaro deba ser renombrada (Ramsey *et al.*, 2019). Esto se debe a que la foresis implica simplemente la utilización de las abejas para transportarse hacia las celdas para comenzar su ciclo

reproductivo (Wheeler, 1919), y la evidencia sugiere que esta etapa de vida es más compleja que simplemente transporte.

3.4.1.3. Efectos de la infestación con *Varroa destructor*

A nivel individual, las consecuencias de la infestación con el ácaro consisten en la pérdida de peso de las abejas (De Jong *et al.*, 1982; Bowen-Walker & Gunn, 2001), una reducción en el contenido de proteínas de la hemolinfa e imposibilidad de asimilarlas (Bowen-Walker & Gunn, 2001; Alaux *et al.*, 2011a), y una reducción de su longevidad (Bowen-Walker & Gunn, 2001; Yang & Cox-Foster, 2007; Alaux *et al.*, 2011a). Además, las abejas sufren inmunodepresión (Alaux *et al.*, 2011; revisado por Amdam and Omholt, 2002), posiblemente asociada al efecto de la alimentación del ácaro de los cuerpos grasos, sitio principal de producción de péptidos antimicrobianos. Por último, *V. destructor* es capaz de transmitir virus a las abejas (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004a; de Miranda & Genersch, 2010) y modificar sus dinámicas poblacionales (Martin *et al.*, 2012), complejizando aún más el cuadro infeccioso. A nivel colonial, estos efectos se traducen en una disminución en la población de abejas pudiendo causar la muerte de la colonia y consecuentemente menores rendimientos productivos (revisado por Rosenkranz *et al.*, 2010).

3.4.1.4. Control de *Varroa destructor*

En la actualidad y en la mayor parte de los países, *V. destructor* es el único patógeno cuyas poblaciones deben ser controladas con tratamientos sintéticos u orgánicos ya que en caso contrario las colonias no logran sobrevivir. Existen cuatro principios activos utilizados para el control de *V. destructor*: cumafós, amitraz, flumetrina, y fluvalinato (revisado por Rosenkranz *et al.*, 2010). La utilización de estos productos es limitada a largo plazo debido a la aparición de poblaciones de varroa resistentes a estos compuestos, fallas comerciales, etc. (Milani, 1999; Maggi *et al.*, 2011). El uso de productos orgánicos como el ácido oxálico y el aceite esencial timol para el control del ácaro constituyen herramientas con gran potencial y su uso en Uruguay se encuentra en auge, obteniéndose muy buenos resultados (Mendoza, comunicación personal). Además, teniendo en cuenta la importancia de este ácaro a nivel sanitario y las

limitaciones para su control, en los últimos años se han comenzado a estudiar poblaciones de abejas *A. mellifera* que logran sobrevivir a la infección del ácaro sin tratamiento (Locke, 2016). Los mecanismos de resistencia de estas poblaciones son fruto de activa investigación ya que constituyen la base para el desarrollo de programas de selección a largo plazo.

3.4.1.5. *Varroa destructor* en Uruguay

En Uruguay, la presencia de *V. destructor* se reportó por primera vez en 1978, volviéndose el mayor problema sanitario para la apicultura uruguaya desde finales de la década del 90 hasta la actualidad (Invernizzi *et al.*, 2011b). Este ácaro se encuentra distribuido a nivel de todo el territorio nacional y posee una prevalencia del $75,7\% \pm 8,4\%$ en marzo (Anido *et al.*, 2016). Su dinámica estacional responde al crecimiento poblacional de las colonias y a la aplicación de tratamientos para su control, con porcentajes de infestación crecientes durante primavera y verano, y una disminución postratamiento en otoño e invierno (Antúnez *et al.*, 2015). Si bien en la mayor parte del territorio los apicultores deben aplicar tratamientos acaricidas para el control del ácaro, existen poblaciones de abejas naturalmente sobrevivientes a su infección las cuales se encuentran en el este del país. Los principales mecanismos de resistencia de las mismas se basan en un mayor comportamiento higiénico, mayor comportamiento de acicalamiento (*grooming*) y una mayor proporción de ácaros “foréticos” en relación a los ácaros reproductivos (Mendoza *et al.*, 2016).

3.4.2. Virus

La existencia de virus infectando las abejas melíferas se conoce desde al menos la década del 60' (Bailey & Gibbs, 1964; Bailey *et al.*, 1964; Bailey & Woods, 1974, 1977), pero debido a que la mayoría de los virus causan infecciones latentes y asintomáticas, a que en general se encuentran coinfectando las colonias y a la dificultad de trabajar con virus purificados, el estudio de las características de sus infecciones y consecuencias a nivel colonial han comenzado a evaluarse en los últimos años.

Actualmente se conocen más de 26 virus que afectan a las abejas *A. mellifera*, siendo siete los más comunes o de mayor relevancia apícola: Virus de la parálisis aguda (ABPV), Virus de las celdas reales negras (BQCV), Virus de las alas deformes (DWV), Virus de la parálisis crónica (CBPV), Virus de la parálisis aguda Israelí (IAPV), Virus Kashmir (KBV) y Virus de la cría ensacada (SBV) (Chen & Siede, 2007; Chen *et al.*, 2014). Todos estos virus poseen un genoma de ARN simple hebra con polaridad positiva. Los virus ABPV, BQCV, DWV, KBV, IAPV y SBV pertenecen al orden Picornavirales, caracterizados por ser virus sin envoltura y con cápside icosaédrica compuesta por las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 (Govan *et al.*, 2000; Leat *et al.*, 2000; Chen & Siede, 2007; Asgari & Johnson, 2010). El ABPV, IAPV y KBV (género Aparavirus) junto con el BQCV (género Cripavirus), pertenecen a la familia Dicistroviridae (International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2014), caracterizados por tener un genoma monopartita bicistrónico (Chen *et al.*, 2004). Por otro lado, el DWV y SBV pertenecen a la familia Iflaviridae (género Iflavirus), y se caracterizan por poseer un genoma monopartita monocistrónico (Ghosh *et al.*, 1999; de Miranda & Genersch, 2010). Por último, la asociación filogenética del CBPV es debatida ya que comparte características con virus de las familias Nodaviridae y Tombusviridae (Ribièrre *et al.*, 2007). Sus principales características morfológicas y genéticas que lo diferencian del resto de los virus que infectan a las abejas *A. mellifera* son su forma elipsoidal y la presencia de un genoma ARN segmentado en dos fragmentos (Ribièrre *et al.*, 2007; Olivier *et al.*, 2008).

Es importante resaltar que el advenimiento de las técnicas moleculares ha permitido el descubrimiento de nuevos virus circulando en las abejas *A. mellifera* y otros insectos polinizadores. Sin embargo, aún se desconoce sus características biológicas, su interacción con el hospedero y las consecuencias de estas infecciones virales (revisado por McMenemy & Flenniken, 2018)

3.4.2.2. Ciclo infectivo

El ciclo de los virus depende exclusivamente de la célula hospedera a la cual ingresa debido a la interacción con un receptor de membrana. Posteriormente el genoma viral es inyectado al citoplasma celular y empleando la proteína VPg se da la traducción de una poliproteína viral. Ésta es clivada en proteínas estructurales y funcionales necesarias para la replicación del genoma permitiendo de esta forma la generación de una molécula de ARN simple hebra de polaridad negativa la cual servirá de molde para la replicación de nuevas hebras ARN con polaridad positiva. Por último, estas hebras se ensamblan con las proteínas estructurales de la cápside dando lugar a la progenie viral (revisado por Ribière *et al.*, 2008).

Si bien *V. destructor* constituye un importante vector de varios de los virus de mayor relevancia apícola, las formas de transmisión son múltiples, siendo la transmisión por contacto, a partir de alimentos contaminados, transmisión venérea y transmisión vertical, las vías de transmisión directa (Shen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; de Miranda & Fries, 2008) (Fig. 4).

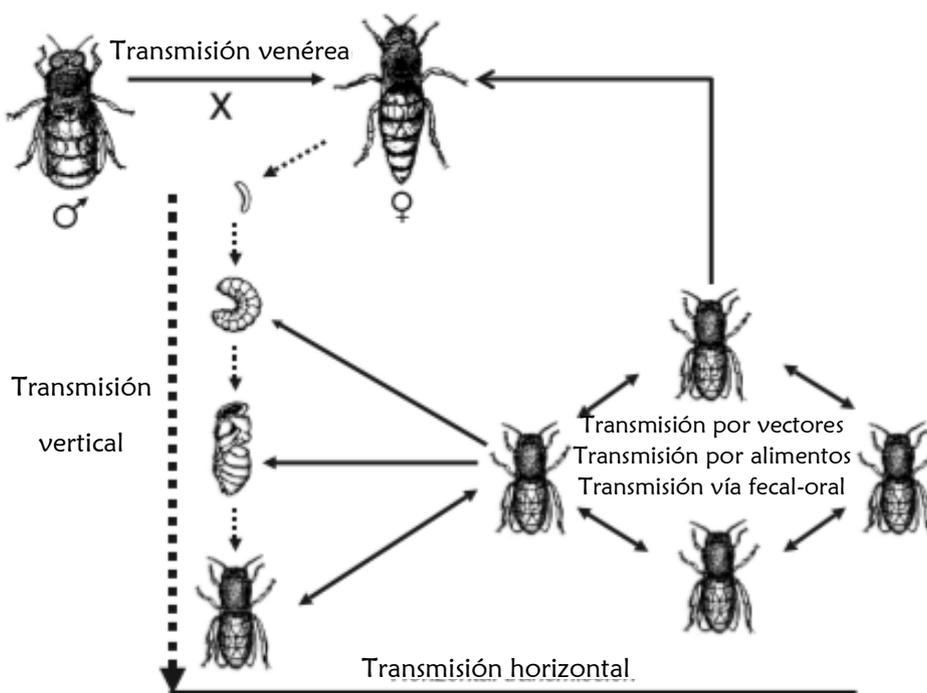


Figura 4. Representación esquemática de las rutas de transmisión de virus en las abejas melíferas, Tomado de: modificado de Chen & Siede, 2007.

1.4.2.3. Efecto de las infecciones virales

Las consecuencias de la infección dependen del virus en cuestión, pudiendo infectar todos los estadios de vida de las abejas y causando en la mayoría de los casos enfermedades asintomáticas (con algunas excepciones) (Chen & Siede, 2007; Genersch & Aubert, 2010). Dichas excepciones se expresan principalmente cuando las abejas tienen altos títulos virales y las mismas se manifiestan como parálisis y muerte del individuo para el ABPV (Bailey *et al.*, 1963; Bailey & Gibbs, 1964; Bailey & Milne, 1969), alas deformes y en ocasiones ausencia total de alas, abdomen globoso y pérdida de color para el DWV (de Miranda & Genersch, 2010), parálisis de las abejas, movimientos temblorosos, pérdida de pelo y coloración oscura para el CBPV (Ribderer & Rothenbuhler, 1976), y muerte de las pupas y disminución de la longevidad de abejas adultas para el SBV (revisado por Ribière *et al.*, 2008).

3.4.2.4. Virus de mayor importancia apícola en Uruguay

En Uruguay, los primeros virus detectados fueron el ABPV y CBPV en el año 2005, siendo éste el primer reporte de virus infectando abejas *A. mellifera* en Latinoamérica (Antúnez *et al.*, 2005). Desde entonces, se han detectado además el BQCV, DWV y SBV (Antúnez *et al.*, 2006). El BQCV se encuentra ampliamente distribuido en todo el territorio nacional, con una prevalencia del $87,4\% \pm 6,4\%$ en el año 2011 (Anido *et al.*, 2016) y sus niveles de infección se mantienen estables durante el año (Antúnez *et al.*, 2015). Los restantes virus detectados se distribuyen principalmente, pero no de forma exclusiva, en el litoral oeste del país, zona de mayor producción apícola (Anido *et al.*, 2016). La prevalencia en 2011 del ABPV fue de $14,6\% \pm 6,8\%$, del DWV fue de $29,1\% \pm 8,8\%$ y del SBV fue de $19,4\% \pm 7,6\%$ y la dinámica de estos virus durante el año se asocia principalmente a la aplicación de tratamientos para el control de *V. destructor* (Anido *et al.*, 2016).

3.4.3. *Nosema* spp.

Hasta la fecha se han reportado tres especies de microsporidios que infectan a las abejas *A. mellifera*: *Nosema apis*, *Nosema ceranae* y *Nosema neumanii* (Fries, 1988; Higes *et al.*, 2006; Chemurot *et al.*, 2016). *Nosema apis* es el patógeno original de *A. mellifera*, mientras que *N. ceranae* es característico de las abejas asiática *A. cerana*. Sin embargo, en 2006 se reportó por primera vez abejas *A. mellifera* naturalmente infectadas con *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2006). Dicho hallazgo coincidió con los reportes de pérdidas masivas de colonias de abejas del hemisferio norte, y luego de exhaustivos estudios, investigadores españoles asociaron a *N. ceranae* con las pérdidas de colonias ocurridas en este país (Higes *et al.*, 2008, 2009). Sin embargo, si bien las consecuencias de la infección con este microsporidio pueden resultar graves en climas templados y escenarios ambientales particulares (revisado por Higes *et al.*, 2013, 2009; Invernizzi *et al.*, 2011; Martín-Hernández *et al.*, 2009), la asociación entre *N. ceranae* y las pérdidas de colonias no ha sido comprobada de forma directa en otros países (Paxton *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Soroker *et al.*, 2011; Stevanovic *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2013). El análisis de muestras de abejas *A. mellifera* tomadas con anterioridad a 1979 ha revelado la presencia de *N. ceranae* (Teixeira *et al.*, 2013) y una amplia distribución a nivel mundial (revisado por Martín-Hernández *et al.*, 2018). Ambos factores sugieren que *N. ceranae* infecta a las abejas *A. mellifera* desde hace mucho tiempo y se ha erróneamente identificado como *N. apis*, o que sus características biológicas, su falta de coevolución con las abejas *A. mellifera* y el traslado constante de estas abejas con fines comerciales, han promovido una rápida dispersión de *N. ceranae* en todo el mundo (Gómez-Moracho *et al.*, 2015). Por último, *N. neumanii* fue reportado recientemente en abejas *A. mellifera* en Uganda, siendo el microsporidio predominante infectando estas abejas en ese país (Chemurot *et al.*, 2016).

3.4.3.2. Ciclo infectivo

Nosema apis, *N. ceranae* y *N. neumanii* se transmiten en forma de espora (Keeling & Fast, 2002), la cual tiene forma ovalada y es la única forma viable fuera de la célula hospedera. Su tamaño varía según la especie, siendo la espora de *N. neumanii* la más pequeña con 2,35 μm de largo (Chemurot *et al.*, 2016), seguida por la de *N. ceranae* con 4,7 μm (Chen *et al.*, 2009b) y la espora de mayor tamaño es la de *N. apis* con 6

μm de largo (Fries *et al.*, 1996). Otra diferencia morfológica que puede contribuir a la discriminación entre estas tres especies es el número de vueltas del filamento polar, estructura clave para la invasión celular (Burges *et al.*, 1974). El número de vueltas de este órgano es de entre 10 y 12 para *N. neumanii* (Chemurot *et al.*, 2016), entre 18 y 23 para *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996), y más de 30 vueltas para *N. apis* (Liu, 1984). Se han descrito tres proteínas constituyentes del filamento polar: PTP1, PTP2 y PTP3, de las cuales PTP1 sería el constituyente principal del mismo y PTP3 clave para el reconocimiento de la célula hospedera posiblemente por ser la más conservada (Cornman *et al.*, 2009).

El ciclo infectivo de *Nosema* spp. comienza una vez que las esporas acceden al intestino de las abejas como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados o al realizar tareas de limpieza de materia fecal. Una vez en el intestino se da la activación de la espora, eversión del filamento polar a causa de un aumento de la presión osmótica de la espora asociada al ingreso de líquido a la misma, inserción del filamento polar en la célula hospedera e ingreso del esporoplasma con todo el contenido interno de la espora a la célula (Fries, 1992) (Fig. 5). Dentro de la célula, *Nosema* spp. atraviesa las etapas de meronte, esporogonia, esporonte y espora madura, las cuales dependen de gran aporte energético obtenido de la célula hospedera (Franzen, 2004; Higes *et al.*, 2007). Cuando la replicación alcanza su máxima expresión, la célula intestinal estalla liberando al medio extracelular las esporas maduras. Dichas esporas son excretadas en la materia fecal siendo fuente de contaminación. En el caso de *N. ceranae*, las esporas son capaces de infectar células ventriculares e inclusive causar una infección sistémica (Chen *et al.*, 2009), lo cual podría asociarse a un efecto incrementado en la patogenicidad de este microsporidio en comparación a *N. apis* (Higes *et al.*, 2007).

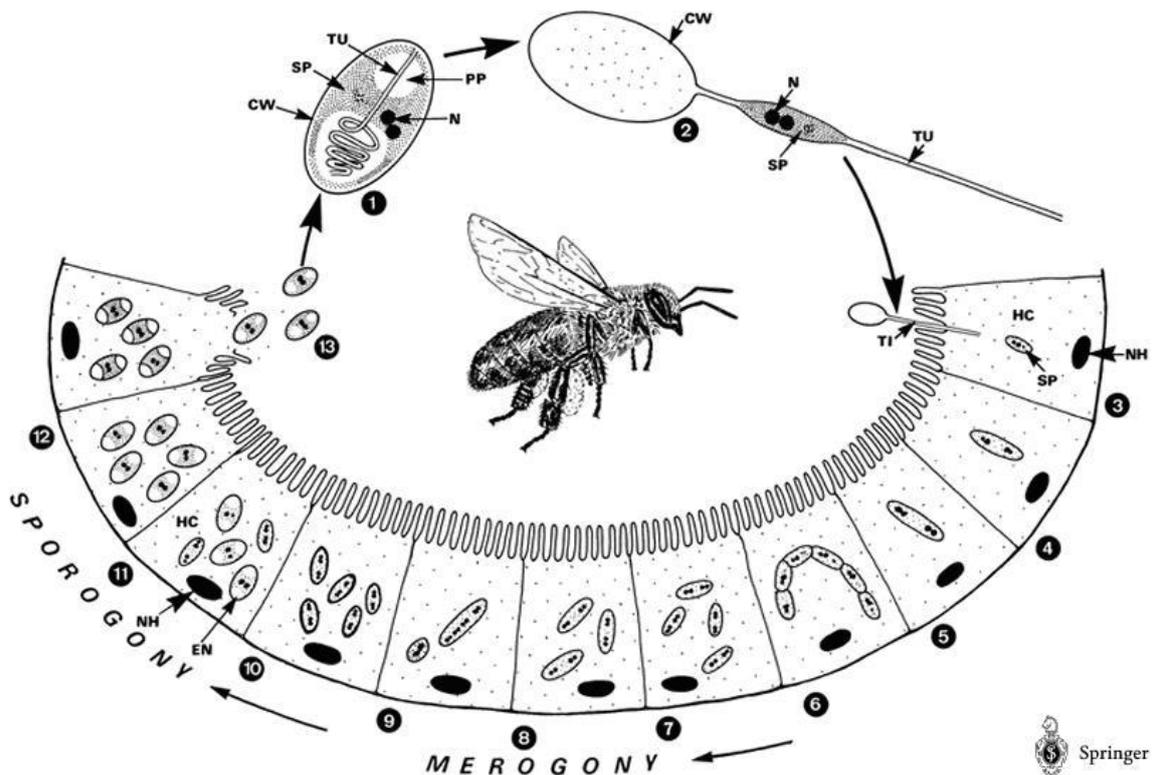


Figura 5. Ciclo infeccioso de *Nosema* spp. CW: pared de la espora. SP: esporoplasma. TU: túbulo polar. N: núcleo. PP: polaroplasto. HC: citoplasma celular. NH: núcleo celular.

3.4.3.3. Características de la enfermedad

Nosema spp. causa la enfermedad conocida como nosemosis de las abejas melíferas. La nosemosis causada por *N. apis* es catalogada como “nosemosis tipo A” y se caracteriza por abdomen globoso de las abejas, intestino de color blanquecino, y manchas de materia fecal en la colmena debido a que las abejas sufren disentería (revisado por Michalczyk and Sokół, 2014). Por otro lado, *N. ceranae* causa la “nosemosis tipo C” (revisado por Higes *et al.*, 2010) y las consecuencias de su infección a nivel de campo son difíciles de distinguir debido a la ausencia de síntomas evidentes: a nivel individual se dan dificultades en la absorción de nutrientes debido a alteraciones del tejido intestinal y cambios en la expresión de compuestos vinculados a la morfogénesis y reparación tisular y de enzimas vinculadas al metabolismo de radicales tóxicos (Alaux *et al.*, 2011b; Dussaubat *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013). Como consecuencia, las abejas sufren estrés energético (Mayack & Naug, 2009; Naug & Gibbs, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011). Además, *N. ceranae* es capaz de suprimir la expresión de genes involucrados con la respuesta inmune de las abejas, dificultando el control de la

infección (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012) y alterar el sistema endócrino, acelerando la transición de tareas y acortando la vida media de las abejas (Dussaubat *et al.*, 2010; Ares *et al.*, 2012). Por lo tanto, los síntomas a nivel colonial se traducen en una despoblación progresiva de las colmenas, con la concomitante disminución en la producción de miel (Botías *et al.*, 2013). Por último, las consecuencias de la infección con *N. neumanii* a nivel individual no han sido caracterizadas, pero a nivel de campo no se han observado síntomas clínicos de la infección por este microsporidio (Chemurot *et al.*, 2016).

3.4.3.4. Control de la nosemosis

El antibiótico utilizado para el control de *Nosema* spp. es la fumagilina (Mc Cowen *et al.*, 1951), pero su efectividad es discutida (Higes *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2013, 2017), y su uso es limitado debido a la posibilidad de dejar residuos en la miel (Higes *et al.*, 2011). Además, la única empresa que producía este producto a nivel mundial cerró recientemente, por lo que su presencia en el mercado es limitada. Existen productos orgánicos para el control de estos microsporidios, pero su uso no es común y los estudios abordando su efectividad son limitados. Más allá de la disponibilidad de productos útiles para controlar las infecciones causadas por *Nosema* spp., las evidencias sugieren que se trata de un patógeno oportunista, cuyas consecuencias de la infección dependen de variables ambientales, de manejo y genéticas, entre otras (Paxton *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2009; Paxton, 2010; Invernizzi *et al.*, 2011a; Fontbonne *et al.*, 2013; Chemurot *et al.*, 2016). Por lo tanto, los umbrales de daño de *Nosema* spp. y las consecuencias de su infección a nivel colonial dependerán de múltiples variables, y esto repercute en la necesidad de aplicar o no tratamientos para su control.

3.4.3.5. *Nosema* spp. en Uruguay

En Uruguay, la especie predominante es *N. ceranae* (Anido *et al.*, 2016), estando presente desde al menos 1990 (Invernizzi *et al.*, 2009). Se encuentra ampliamente distribuido en todo el territorio nacional y en un relevamiento realizado en el año 2011 se encontró una prevalencia de 14,6% \pm 6,8% en marzo (Anido *et al.*, 2016). Sin

embargo, esta prevalencia aumenta sensiblemente cuando las colmenas son trasladadas a plantaciones de *Eucalyptus grandis* al norte del país, ambiente en el cual todas las colmenas se infectan con este microsporidio alcanzando altos niveles de infección (Invernizzi *et al.*, 2011a; Mendoza *et al.*, 2012, 2014). Esta práctica apícola es comúnmente realizada por los apicultores uruguayos para aprovechar el gran flujo de néctar que provee la floración otoñal de estos árboles, y aumentar los rendimientos productivos (revisado por C Invernizzi *et al.*, 2020). Por otro lado, la presencia de *N. apis* se ha detectado de forma esporádica y en coinfección con *N. ceranae* (Antúnez *et al.*, 2015). En Uruguay, los niveles de infección aumentan hacia la primavera, mientras que en otros países se ha reportado que la variación anual del microsporidio depende de las características ambientales de las distintas regiones (Antúnez *et al.*, 2015; Pacini *et al.*, 2016).

3.5. Sistema inmune de las abejas melífera

Existen múltiples mecanismos de defensa tanto a nivel social e individual para limitar el ingreso, establecimiento y transmisión de estos patógenos a todos los miembros de la sociedad (revisado por Cremer *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2006).

La secuenciación del genoma de las abejas evidenció una reducción en los genes vinculados a la inmunidad individual en comparación a insectos solitarios y dicha reducción se asocia a que, en las abejas melíferas, los mecanismos de defensa sociales priman en comparación a los individuales (Elsik *et al.*, 2014; revisado por Evans *et al.*, 2006; Weinstock *et al.*, 2006). De hecho, se plantea que la inmunidad social podría haber jugado un rol clave en el surgimiento y mantenimiento de la vida en sociedad, representando un carácter ancestral y no un carácter secundario derivado de la eusocialidad (Meunier, 2015; Van Meyel *et al.*, 2018). Evidencia a favor de esta hipótesis constituye la similitud entre los mecanismos de inmunidad social y los encontrados a nivel de organismos solitarios multicelulares, como por ejemplo el aumento de temperatura corporal para limitar infecciones a nivel individual y la fiebre comportamental a nivel social (Starks *et al.*, 2000).

3.5.1. Inmunidad social

En el caso de las abejas melíferas, los mecanismos de inmunidad social involucran comportamientos para evitar el ingreso de patógenos, como la presencia de abejas guardianas de mediana edad, la reducción de espacios destinados al ingreso al nido de cría y comportamientos de exclusión de abejas enfermas (revisado por Cremer *et al.*, 2007). Asimismo, dentro de la colmena se dan comportamientos que contribuyen a evitar el establecimiento de un foco infeccioso. Entre estos comportamientos se destaca la limpieza y desinfección mediante la utilización de propóleos y enzimas con actividad antiséptica (White *et al.*, 1963; Simone-Finstrom & Spivak, 2010, 2012) y la encapsulación o encierro de organismos plaga como sucede con el pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*) (Neumann *et al.*, 2001). Además, la división de tareas edad-dependiente juega un rol muy importante en la limitación de la dispersión de los patógenos, ya que a pesar de que las abejas guardianas y pecoreadoras (las de mayor edad) son las que tienen mayores probabilidades de ingresar patógenos a la colmena, el escaso contacto con la cría, reina y nodrizas minimiza el contagio (revisado por Cremer

et al., 2007). Otros dos comportamientos sumamente importantes a nivel de la inmunidad social son el *grooming* y el comportamiento higiénico. El *grooming* implica la remoción de patógenos externos de sí mismas (*autogrooming*) o de sus compañeras (*allogrooming*) (Peng *et al.*, 1987). El comportamiento higiénico implica la detección de larvas y pupas infectadas y su limpieza o remoción de la colmena (revisado por Boecking and Spivak, 1999). Tanto el *grooming* como el comportamiento higiénico juegan un rol muy importante en el control natural de *V. destructor*, mecanismos compartidos entre *A. mellifera* y *A. ceranae* (revisado por Boecking and Spivak, 1999; Peng *et al.*, 1987). Por último, también existen mecanismos para inhibir la transmisión de los patógenos como la fiebre comportamental. Este comportamiento es efectivo para ciertas plagas como avispa y consiste en la formación de una bola de abejas encerrando al predador y aumento de la temperatura por movimiento de alas a niveles en los que dicha plaga no puede soportar (Starks *et al.*, 2000).

Por otro lado, el apareamiento de la reina con varios zánganos aumenta la variabilidad genética intracolonia. Esto determina la existencia de subfamilias con distinto grado de susceptibilidad a los patógenos (Liersch & Schmid-Hempel, 1998; Seeley & Tarpy, 2007).

Otro mecanismo de inmunidad social es la transferencia de inmunidad transgeneracional (Sadd *et al.*, 2005). Si bien las abejas no poseen inmunidad adaptativa, se ha planteado que las mismas transfieren PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) de la reina a su descendencia permitiéndoles defenderse en mayor medida frente a una posterior infección (Sadd *et al.*, 2005). Dichos PAMPs son procesados por las abejas nodrizas, transportados por la Vg hacia las glándulas hipofaríngeas y suministrados a la reina en la jalea real (Harwood *et al.*, 2019). Una vez que la reina procesa dichos PAMPs a nivel intestinal, los mismos son transferidos y movilizados por la Vg hacia los ovarios, pudiendo ser incorporados a su descendencia (Salmela *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la transferencia de inmunidad transgeneracional es relevante para que las larvas resulten menos susceptibles a la infección con *P. larvae* (Hernández López *et al.*, 2014).

Por último, se ha planteado que la microbiota de las abejas melíferas contribuye a montar una respuesta inmune, por lo que los procesos sociales que determinan la

adquisición de una comunidad microbiana estable son claves en este aspecto (Evans & Spivak, 2010; Kwong *et al.*, 2017).

3.5.2. Inmunidad individual

Una vez que el patógeno logra vencer los mecanismos de defensa social, debe atravesar en primer lugar las barreras físicas y químicas de las abejas como el exoesqueleto, membrana peritrófica, acidez intestinal y secreciones antimicrobianas. Vencidos dichos mecanismos, se ponen en marcha los mecanismos de inmunidad individual. Dichos mecanismos implican procesos humorales y celulares (Evans *et al.*, 2006).

Una vez que los patógenos ingresan a las abejas, sus PAMPs son reconocidos por diferentes receptores que dan lugar a la activación de cuatro cascadas de señalización diferentes; Toll, IMD, Jak-Stat y JNK (Evans *et al.*, 2006). La cascada de señalización Toll se activa frente a la exposición a bacterias Gram +, virus y hongos. En esta cascada se destaca la citoquina extracelular Spatzle, que se une al receptor celular Toll (TLR), desencadenando una serie de eventos intracelulares que determinan la traslocación del factor de transcripción Dorsal. Dorsal activa la transcripción de péptidos antimicrobianos, la cascada melanización y 3 lisozimas con actividad lítica (Evans *et al.*, 2006). Por otro lado, la cascada IMD se activa principalmente frente a la exposición a bacterias Gram - y virus. En esta cascada, uno de los efectores claves es la proteína de reconocimiento de peptidoglicano bacteriano (PGRP-LC) que induce la cascada de activación intracelular vía el factor IMD, promoviendo la traducción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de apoptosis celular (Evans *et al.*, 2006). Las cascadas de activación Jack Stat y JNK son las menos caracterizadas en las abejas melífera, estando involucradas en la activación de la óxido nítrico sintasa, en la inducción de factores tipo complemento, proliferación de hemocitos y activación de genes antimicrobianos (Evans *et al.*, 2006).

La activación de las distintas cascadas desencadena distintos mecanismos efectores, como la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, la cascada de activación de melanización y mecanismos celulares mediados por hemocitos como la fagocitosis, nodulación y encapsulación, y de la producción de factores de inmunidad humoral asociados a la melanización (revisado por

Hillyer, 2016). Además, también se han identificado mecanismos de respuesta antiviral como la mediada por el ARN de interferencia y la apoptosis (Evans *et al.*, 2006).

Se han descrito solo seis AMPs en las abejas *A. mellifera*: abaecina, apidecina, dos defensinas, apisinina e himenoptecina (Casteels *et al.*, 1989, 1990, 1993; Evans *et al.*, 2006). Por otro lado, las abejas también poseen tres lisozimas (Evans *et al.*, 2006), las cuales contribuyen a la lisis del patógeno mediante la hidrólisis de los enlaces β -1-4 glucosídicos del peptidoglicano de la pared bacteriana, y puede además activar el proceso de melanización. Dicho proceso se activa cuando los PAMPs son reconocidos por receptores que dan lugar a una cascada compleja de hidrólisis y oxidaciones utilizando la tirosina como sustrato inicial y dando lugar a quinonas como producto final, siendo la enzima fenol oxidasa clave en este proceso. Las quinonas forman alrededor del patógeno una cubierta de melanina que se manifiesta fenotípicamente como una cápsula proteica oscura (revisado por Hillyer, 2016).

La fagocitosis está mediada por hemocitos del tipo fagocitos y consiste en la internalización del patógeno en un fagosoma y digestión del mismo por enzimas proteolíticas luego de la unión entre el fagosoma y lisosoma. La encapsulación consiste en el encapsulamiento del patógeno por varios hemocitos, y se activa principalmente frente a la infección con patógenos de gran tamaño (revisado por Hillyer, 2016). Por otro lado, los mecanismos de nodulación se ponen en marcha frente a la agregación de bacterias las cuales son rodeadas por hemocitos que liberan enzimas proteolíticas. Tanto la nodulación como la encapsulación, son acompañados en general, por la melanización (revisado por Hillyer, 2016).

Por otro lado, la apoptosis contribuye a limitar la infección. La apoptosis es una forma de muerte celular programada, cuyo mecanismo molecular en las abejas melífera no está aún dilucidado en detalle, pero estarían involucrados componentes de la cascada de señalización IMD y JNK (Evans *et al.*, 2006). *Nosema apis* y *N. ceranae* son capaces de manipular la célula inhibiendo los mecanismos de apoptosis y promoviendo la proliferación celular, asegurando la supervivencia de la célula hospedera y logrando replicarse en ella de forma exitosa (Higes *et al.*, 2013a; Kurze *et al.*, 2015; Martín-Hernández *et al.*, 2017).

Doublet y colaboradores (2017) realizaron un exhaustivo estudio bioinformático para determinar los mecanismos de respuesta comunes y específicos de las abejas melífera

para combatir la infección de los distintos patógenos que la afectan. Dichos autores encontraron que la expresión de péptidos antimicrobianos (defensina 1, abaecina, apidecina, himenoptecina y lisozima), proteínas cuticulares y proteínas de shock térmico son los grupos de genes activados frente a la infección. Posiblemente, la activación de genes pertenecientes a estos últimos dos grupos se deba a la reparación de daño tisular y al estrés generado por la infección, respectivamente (Doublet *et al.*, 2017).

3.6. Microbiota intestinal de las abejas melíferas

Existe una constante interacción entre los animales, el ambiente y los microorganismos que en él habitan. Si bien históricamente se ha hecho especial énfasis en el estudio de microorganismos con potencial patogénico, durante los últimos años se ha prestado especial atención a las microbiotas nativas. Dichas microbiotas son consideradas actualmente en organismos multicelulares como otro órgano, con funciones asociadas al mantenimiento de la homeostasis del hospedero (Lee & Hase, 2014; Esser *et al.*, 2019). De esta forma, el modelo moderno de salud implica el estudio de cada animal como un ecosistema, dejando de lado la visión de organismos individuales. En este sentido, el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido profundizar en la caracterización y función de estas microbiotas.

La comunidad microbiana intestinal de las abejas es simple, estable, y se encuentra compartimentada a lo largo del tubo digestivo (Engel *et al.*, 2012; Engel & Moran, 2013a). Estas características, junto a que individuos representantes de dicho microbiota son compartidos con abejorros del género *Bombus* spp., sugiere una fuerte coevolución entre las abejas y su microbiota intestinal (Martinson *et al.*, 2011; Engel & Moran, 2013c; Cariveau *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016, 2017; Emery *et al.*, 2017). En este sentido, el hecho que estos individuos compartidos se hayan diversificado en *A. mellifera* pero no así en *Bombus* spp. (Engel *et al.*, 2014), sugiere que posiblemente la comunidad microbiana de ambas especies descende de una comunidad presente en un ancestro común 85 millones de años atrás (Cardinal *et al.*, 2010; Engel *et al.*, 2014), evidenciando un vínculo muy estrecho y antiguo. El mantenimiento de esta comunidad microbiana intestinal se asocia a un contacto activo entre los miembros de la colonia e intercambio microbiano frecuente mediante las interacciones sociales, así como las prácticas apícolas y la historia de vida de la colonia (Engel *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 2016). Este último

aspecto juega un rol clave en el mantenimiento de la diversidad microbiana, ya que el hecho que las colonias de abejas *A. mellifera* sean iniciadas por un gran número de individuos (y eventualmente la reina) evita un cuello de botella, a diferencia por ejemplo de colonias de *Bombus* spp., las cuales son fundadas por un único individuo y en cuyas poblaciones ya se ha demostrado una comunidad bacteriana con baja diversidad intraespecífica (Powell *et al.*, 2016).

La comunidad microbiana intestinal de las abejas está formada por 5 grupos bacterianos principales (“core”): *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi*, *Lactobacillus* Firm-4 y Firm-5 y *Bifidobacterium asteroides* (revisado por Kwong & Moran, 2017; Raymann & Moran, 2018). Este core microbiano puede estar acompañado además por *Bartonella apis*, *Apibacter adventoris*, *Frischella perrara* y Acetobacteraceae (Raymann & Moran, 2018).

El estudio del metagenoma bacteriano intestinal de las abejas ha permitido identificar algunas de las funciones de esta comunidad bacteriana. Se ha reportado que la microbiota intestinal posee genes vinculados al metabolismo de carbohidratos destacándose genes asociados al desdoblamiento de la sacarosa (principal fuente de energía de las abejas) y de la manosa (Engel *et al.*, 2012). Este carbohidrato resulta tóxico para las abejas (Barker, 1977), por lo que la presencia de estos genes sugiere que existen en la microbiota intestinal, bacterias que podrían cumplir funciones de detoxificación de metabolitos secundarios de plantas (Engel *et al.*, 2012). También se han identificado genes codificantes de enzimas vinculadas a la degradación de pectinas (Engel *et al.*, 2012). De esta forma, las bacterias con dichas enzimas podrían contribuir a la liberación del contenido nutricionalmente rico del polen o simplemente al desdoblamiento de estas pectinas para que no resulten tóxicas a las abejas. Resulta interesante el hecho que uno de los grupos microbianos predominante asociado a dicha actividad es *G. apicola* (Zheng *et al.*, 2019) y esta función es realizada por ciertas cepas (Engel *et al.*, 2012), sugiriendo que la diversidad genética microbiana cumple un rol clave en la funcionalidad de la microbiota y su estrecha vinculación con su hospedero. Por último, se han identificado genes vinculados a la formación de *biofilm*, codificados por *G. apicola* y *S. alvi* (Engel *et al.*, 2012; Martinson *et al.*, 2012). Estos microorganismos son dominantes en la comunidad microbiana intestinal de *Bombus* spp., la cual confiere protección frente a la infección con un protozoario (*Chritidia*

bombi) (Koch & Schmid-Hempel, 2011). De esta forma, la presencia de estos grupos microbianos podría cumplir similares funciones en *A. mellifera* (Engel *et al.*, 2012).

El establecimiento de esta comunidad microbiana intestinal se da en etapa de individuos adultos, ya que el hecho que sufran distintas mudas impide el establecimiento de una comunidad microbiana intestinal estable hasta luego de la emergencia del individuo adulto (revisado por Engel and Moran, 2013). De hecho, previo a emerger las abejas adultas defecan vaciando casi por completo su contenido intestinal. Durante las primeras 24 horas la abundancia bacteriana intestinal se mantiene en valores muy bajos, creciendo de forma exponencial a partir del segundo día y logrando establecerse entre el cuarto y sexto día post-emergencia (Powell *et al.*, 2014). Existen distintos mecanismos por los cuales las abejas adquieren su comunidad microbiana intestinal, como trofalaxis, contacto superficial con las nodrizas, contacto con la materia fecal y a través de los alimentos, favoreciendo cada uno de ellos la adquisición de los distintos grupos bacterianos (Powell *et al.*, 2014).

Estos hallazgos resaltan la importancia de la presencia y del mantenimiento de esta comunidad microbiana intestinal.

De acuerdo a lo expuesto a lo largo de esta sección, existen distintos factores que afectan la homeostasis de las abejas melíferas tanto a nivel individual como colonial. Esta tesis se centró en el estudio de la interacción de dos de esos factores: el estrés nutricional y la sanidad.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

El estrés nutricional afecta las reservas nutricionales de las abejas, los mecanismos vinculados a la regulación del cambio de comportamiento y a su respuesta inmune, aumentando su susceptibilidad frente a la infección con patógenos y disminuyendo su longevidad. Dichos efectos a nivel individual tienen un fuerte impacto en la fortaleza, estado sanitario, productividad y supervivencia colonial.

4.2. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es evaluar cómo influye el estrés nutricional en distintas variables asociadas a la fisiología de la abeja y a su estado sanitario, tanto a nivel individual como colonial.

4.3. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- 1) Evaluar el efecto del estrés nutricional de forma independiente y en interacción con *Nosema ceranae* en
 - i) la supervivencia de las abejas,
 - ii) la expresión de genes vinculados a el estado nutricional, comportamental e inmunológico de las abejas, y
 - iii) los niveles de infección con el Virus de alas deformes.
- 2) Analizar el efecto de la microbiota intestinal y de las interacciones con abejas nodrizas en la supervivencia y expresión génica de abejas recién emergidas alimentadas con polen potencialmente tóxico.
- 3) Determinar el efecto del estrés nutricional en la fortaleza, estado sanitario y productividad de colonias de abejas melíferas.

- 4) Evaluar el efecto de la suplementación invernal con polen polifloral, en colmenas sometidas a estrés nutricional, como estrategia para mejorar la fortaleza de las colmenas.

El primer objetivo específico es abordado en el capítulo 1, el segundo objetivo específico en el capítulo 2, mientras que los objetivos 3 y 4 son abordados en el tercer capítulo de la tesis.

5. CAPÍTULO 1- Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas y en la infección con *Nosema ceranae* y el DWV

5.1. Introducción

Durante los últimos años se han reportado alrededor del mundo altos porcentajes de pérdidas de colonias de abejas *Apis mellifera*, y la desnutrición de las abejas y la infección con múltiples plagas y patógenos son dos de los principales factores asociados a dichas pérdidas (Carreck & Neumann, 2010; Steinhauer *et al.*, 2018; Gray *et al.*, 2019). En este sentido, las grandes extensiones de monocultivos han determinado que las abejas tengan disponible polen de un único origen botánico y en un tiempo acotado, lo cual no necesariamente suministra los requerimientos nutricionales que las abejas precisan. En Uruguay, uno de los monocultivos mayormente explotados por los apicultores son las plantaciones de *E. grandis*. Dichas plantaciones florecen en otoño y los apicultores trasladan sus colmenas hacia estos ambientes al final del verano para aprovechar su potencial nectarífero. Sin embargo, las colonias se debilitan sensiblemente hacia el final de la floración y se ha asociado dicho debilitamiento a la calidad nutricional del polen de *Eucalyptus* spp. y a las altas tasas de infección con *N. ceranae* con las que las colmenas terminan esta zafra productiva (Invernizzi *et al.*, 2011a; Mendoza *et al.*, 2012, 2014). Sin embargo, no se conoce con certeza los efectos de la alimentación con el polen de *E. grandis* en la fisiología de las abejas y la razón por la cual su consumo determina tales consecuencias sanitarias.

Nosema ceranae es un microsporidio que afecta las células epiteliales del intestino de las abejas causando desórdenes nutricionales (Higes *et al.*, 2007; Fries, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2018). A partir de ensayos realizados con abejas criadas en condiciones de laboratorio, se ha planteado que este microsporidio se multiplica más en aquellas abejas alimentadas con polen, en comparación a abejas alimentadas con dietas con ausencia de proteínas. Sin embargo, las abejas alimentadas con polen sobreviven más tiempo (Porrini *et al.*, 2011; Basualdo *et al.*, 2014a; Jack *et al.*, 2016), por lo que los beneficios asociados a una buena nutrición permitirían compensar los efectos negativos de la infección. Adicionalmente, se ha planteado que *N. ceranae* es capaz de interactuar con el virus DWV (Costa *et al.*, 2011; Doublet *et al.*, 2015), virus involucrado en las

pérdidas de colonias (Dainat *et al.*, 2012a; b), complejizando el panorama y dificultando la posibilidad de discriminar los efectos de los distintos patógenos.

La hipótesis de este capítulo es que el estrés nutricional afecta las reservas nutricionales de la abeja, los mecanismos vinculados a la regulación del cambio de comportamiento y su respuesta inmune. Esto repercute en su susceptibilidad frente a infección con patógenos y en su longevidad. Las predicciones asociadas consisten en que abejas bajo estrés nutricional extremo (alimentación basada en carbohidratos) o alimentadas con pólenes monoflorales tendrán menor longevidad, menor expresión de genes vinculados a la nutrición, cambio de comportamiento y respuesta inmune y menor nivel de infección con el DWV. Todos estos factores se intensifican cuando las abejas están infectadas con *N. ceranae*.

Un abordaje metodológico que permite analizar de forma particular el efecto de la nutrición y de la sanidad sobre la fisiología de las abejas es el uso de abejas confinadas en condiciones de laboratorio. Si bien este abordaje no permite analizar las complejas interacciones sociales que se dan en la naturaleza, existen marcadores moleculares como la Vg y la HJ cuya expresión está asociada tanto al estado nutricional de las abejas como comportamental (Robinson, 1992; Hartfelder & Engels, 1998; Schulz *et al.*, 2002; Amdam & Omholt, 2003). Por lo tanto, son marcadores moleculares adecuados para comparar, entre otras variables, el efecto de los distintos regímenes nutricionales en la fisiología y comportamiento de las abejas a lo largo del tiempo. Además, teniendo en cuenta que la respuesta inmune de las abejas varía de acuerdo a su comportamiento (Amdam *et al.*, 2004, 2005) y que ambos factores se ven influenciados por la nutrición (Toth, 2005; Toth & Robinson, 2005; Alaux *et al.*, 2010; Ament *et al.*, 2010), resulta necesario analizar en paralelo la expresión de genes vinculados a todas estas funciones y a lo largo de la vida de las abejas para poder obtener un escenario más completo.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto del estrés nutricional en la supervivencia de las abejas, la expresión de genes vinculados a su estado nutricional, comportamental e inmunológico, y los niveles de infección con *N. ceranae* y el DWV.

5.2. Estrategia experimental

Para alcanzar el objetivo propuesto, se realizaron dos experimentos.

En primer lugar, se analizó el efecto de distintas dietas en la fisiología de las abejas y en la infección natural con el DWV. Para esto, se tomaron abejas recién emergidas, se dividieron en grupos y se aplicaron cuatro tratamientos: i) administración únicamente de jarabe de sacarosa y sin polen, como modelo de estrés nutricional extremo, ii) administración de polen de *E. grandis*, como modelo de dieta monofloral baja en lípidos, potencialmente pobre desde el punto de vista nutricional, iii) administración de polen de *Baccharis trimera* (carqueja), como otro modelo de dieta monofloral pero con alto contenido de lípidos, y iv) administración de polen polifloral (proveniente de distintos orígenes botánicos), como ejemplo de dieta potencialmente ideal. Además, a todas las abejas de los tratamientos que recibieron polen, también se les suministró jarabe de sacarosa como fuente de carbohidratos. Las dos especies monoflorales empleadas florecen en otoño en Uruguay y son dos de los recursos más explotados por las abejas en esta época del año.

Con el fin de evaluar el efecto de estas dietas en la fisiología de las abejas, se analizó la supervivencia de las abejas, el consumo de polen y se tomaron muestras a distintos tiempos para evaluar su efecto en la expresión de genes asociados a distintas vías fisiológicas de las abejas y a la infección natural con el DWV.

En el segundo ensayo se incorporó la infección con *N. ceranae* como variable sanitaria. Las abejas se dividieron en tres grupos: i) administración únicamente de jarabe de sacarosa, para analizar los efectos del déficit nutricional extremo, ii) administración de polen de *E. grandis*, y iii) administración de polen polifloral. El criterio de selección de estas últimas dos dietas fue el mismo que el mencionado para el primer ensayo. Todas las abejas recibieron también jarabe de sacarosa durante el transcurso del ensayo. Cada grupo se dividió a su vez en dos subgrupos, uno de los cuales se infectó con esporas de *N. ceranae* y el otro se mantuvo como control sin infectar. Se analizó la supervivencia de las abejas, el peso de las abejas muertas como indicador nutricional y se tomaron muestras a distintos tiempos con el fin de evaluar el efecto de las distintas dietas y la infección con *N. ceranae* en la expresión de genes vinculados a distintas vías fisiológicas de las abejas y en la infección natural con el DWV.

5.3. Metodología

5.3.1. Dietas utilizadas

Para la realización de los distintos ensayos se utilizó pan de polen (polen ensilado). Con el objetivo de simplificar la lectura, a lo largo de la tesis se habla de polen de forma genérica. Si bien en los dos ensayos se utilizó polen polifloral y polen de *E. grandis*, debido a que se realizaron en años diferentes, se utilizaron pólenes de ambos tipos colectados en distintos momentos.

El polen polifloral se colectó a partir de marcos de colmenas sanas (sin síntomas clínicos de ninguna enfermedad), pertenecientes a la sección Apicultura de INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). El polen empleado en el primer ensayo se colectó durante el verano 2014-2015 (diciembre-febrero) y se denominó polen polifloral 1. El polen empleado en el segundo ensayo se colectó durante el verano 2016-2017, y se denominó polen polifloral 2.

Por otro lado, se utilizó polen monofloral de *E. grandis* y de *B. trimera*. El polen de *E. grandis* se colectó de panales de colmenas ubicadas en una plantación de estos árboles, mientras que el polen de *B. trimera* se colectó de panales de colmenas ubicadas en una zona con gran abundancia de plantas silvestres donde la especie principal era *B. trimera*. El polen empleado en el primer ensayo se colectó durante el otoño de 2015 (*E. grandis* 1 y *B. trimera*), mientras que el polen empleado en el segundo ensayo se colectó en el otoño de 2017 (*E. grandis* 2).

Los panales con polen se congelaron a -20°C y el polen se extrajo utilizando una máquina diseñada para tal fin (Bee Bread Harvester Mini, Wilara JSC, Lituania). Para el caso de los pólenes monoflorales, se chequeó que los *pellets* de polen obtenidos fueran de color uniforme y característico de las dos especies empleadas (*E. grandis*: color amarillo-mostaza; *B. trimera*: color naranja intenso), y se removieron de forma manual las capas de polen de diferente color. El polen resultante se homogeneizó en una proporción de 15:1 polen - jarabe de sacarosa al 50%. El polen polifloral 1 se dividió en porciones de 500 gr cada una para ser utilizado en ensayos de laboratorio y campo (de los tres capítulos de esta tesis). Los pólenes a utilizar se enviaron al *Bee Research Laboratory* (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA) con refrigerantes, y luego se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados. Se analizaron distintos

parámetros de calidad del polen según se describe en las siguientes secciones y la presencia de patógenos según se describe en la sección 5.3.7.

5.3.1.1. Origen botánico del polen

Con el fin de determinar el origen botánico de los diferentes pólenes, 2 gr de polen por muestra se hidrataron en agua destilada, se colocaron en un portaobjeto y se observaron mediante microscopía óptica (400X). Se identificaron al menos 1200 granos de polen por muestra, mediante la comparación con una colección de referencia. El porcentaje de cada especie botánica se calculó en relación al total de granos de polen identificados (Louveaux *et al.*, 1978). Dichos análisis fueron realizados por la MSc. Estela Santos en la Facultad de Ciencias, UdelaR.

5.3.1.2. Contenido de proteínas

Para determinar el porcentaje de proteínas de los pólenes utilizados, se tomaron 5 gr de polen por muestra, se desecaron a 60°C y se analizaron mediante el método de digestión ácida de Kjeldahl (Somerville, 2001) en el laboratorio de Nutrición Animal de INIA La Estanzuela.

5.3.1.3. Contenido de aminoácidos y lípidos

Con el objetivo de determinar la calidad nutricional del polen se analizó su porcentaje de lípidos y su composición de aminoácidos. Dicho análisis se realizó a todas las muestras de polen a excepción del polen de *B. trimera*. Una muestra de cada polen se envió al laboratorio CBO (Brasil) para los restantes análisis. La proporción de lípidos se determinó a partir de 2 gr de polen según el método descrito en el Compendio Brasileiro de Alimentación Animal (Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2013). A su vez, se determinó la proporción de 19 aminoácidos, incluyendo todos los esenciales para las abejas (de Groot, 1953): histidina, arginina, treonina, valina, metionina, leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina y triptófano (esenciales), y ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, taurina, alanina, prolina, tirosina y cisteína (no esenciales).

Para el análisis de estos aminoácidos, a excepción del triptófano, se utilizaron 115 mg de polen, mientras que para el análisis de triptófano se utilizaron 62 mg de polen. Dicho polen se procesó y la determinación de la composición de aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Lucas & Sotelo, 1980; White *et al.*, 1986; Hagen *et al.*, 1993).

5.3.1.4. Contenido de pesticidas

Debido a que el polen es una matriz que puede almacenar pesticidas potencialmente tóxicos para las abejas, se determinó el contenido de los principales pesticidas de uso común en la agricultura y apicultura en Uruguay. Este ensayo se realizó únicamente en el polen polifloral 1 ya que fue el utilizado en la mayor parte de los ensayos de laboratorio, así como de campo. Para esto, una muestra de polen (5 gr) se envió al Departamento de Química del Litoral del Polo Agroalimentario y Agroindustrial del Centro Universitario Regional Litoral Norte, UdelaR (Uruguay). La muestra se procesó y la concentración de pesticidas se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), siguiendo el protocolo descrito por Niell y colaboradores (2015). Los pesticidas analizados fueron: acetamiprid, atrazina, azoxistrobin, boscalid, carbarilo, carbendazim, clotianidín, cipermetrina, clorfenvinfos (Z + E), clorotalonil, clorpirifos-etil, clorpirifos-metil, cumafós, diazinon, dimetoato, endosulfán sulfato, fipronil, haloxifop metil, hexyiazox, imazalil, imidacloprid, iprodiona, lambda cialotrina, metomilo, matidation, p,p-DDE, p,p-DDT, piraclostrobin, tau-fluvalinato, tebuconazole, tiacloprid, tiametoxam y trifluralin. Vale la pena aclarar que existen pesticidas de uso común e intensivo en agricultura, como por ejemplo el glifosato, que no se encuentran en esta lista debido a limitaciones técnicas. Para aquellos pesticidas detectados, se calculó el número de veces que la concentración superó o estuvo por debajo de la DL50 reportada para abejas *A. mellifera* utilizando como referencia la base de datos de la Universidad de Hertfordshire (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/>).

5.3.2. Ensayo 1: Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas

Este ensayo se realizó a principios del otoño de 2015 en el *Bee Research Laboratory* (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA), utilizando abejas recién emergidas. Se colectaron tres cuadros de cría operculada pronta para emerger provenientes de tres colmenas y se incubaron a $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 70% de humedad. Las abejas emergidas luego de 12 horas de incubación se mezclaron cuidadosamente para uniformizar las diferencias genéticas que pudiera haber entre ellas, y se colocaron en grupos de 70 abejas por jaula. Se establecieron cuatro tratamientos de acuerdo a la dieta que recibieron (cuatro réplicas por tratamiento): i) alimentación únicamente con jarabe de sacarosa al 50% (control de estrés nutricional extremo), ii) alimentación con jarabe de sacarosa y polen de *E. grandis* (dieta monofloral potencialmente pobre desde el punto de vista nutricional), iii) alimentación con jarabe de sacarosa y polen de *B. trimeria* (dieta monofloral con alto contenido en lípidos), y iv) alimentación con jarabe de sacarosa y polen polifloral 1 (dieta potencialmente ideal desde el punto de vista nutricional).

Todas las jaulas se incubaron a $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 70% de humedad. Las abejas se alimentaron *ad libitum* tanto con el jarabe como con el polen, y el alimento se cambió a diario para que estuviera siempre fresco. De las cuatro réplicas por tratamiento, tres se utilizaron para analizar la supervivencia de las abejas. Para esto, todas las jaulas se monitorearon a diario, se removieron las abejas muertas y se registraron en una planilla de datos. Dichas jaulas se utilizaron también para determinar el consumo diario de polen. Por otro lado, la cuarta jaula se utilizó para analizar la expresión génica de las abejas. Las abejas destinadas a estos análisis se muestrearon a tiempo 0 (abejas recién emergidas) y a los 7 y 14 días post emergencia. Cada muestreo consistió en la colecta de 8 abejas por jaula (total 8 abejas por tratamiento). Las abejas colectadas se sacrificaron en etanol y hielo seco y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta el momento de ser procesadas.

El diseño experimental se esquematiza en la Figura 6.

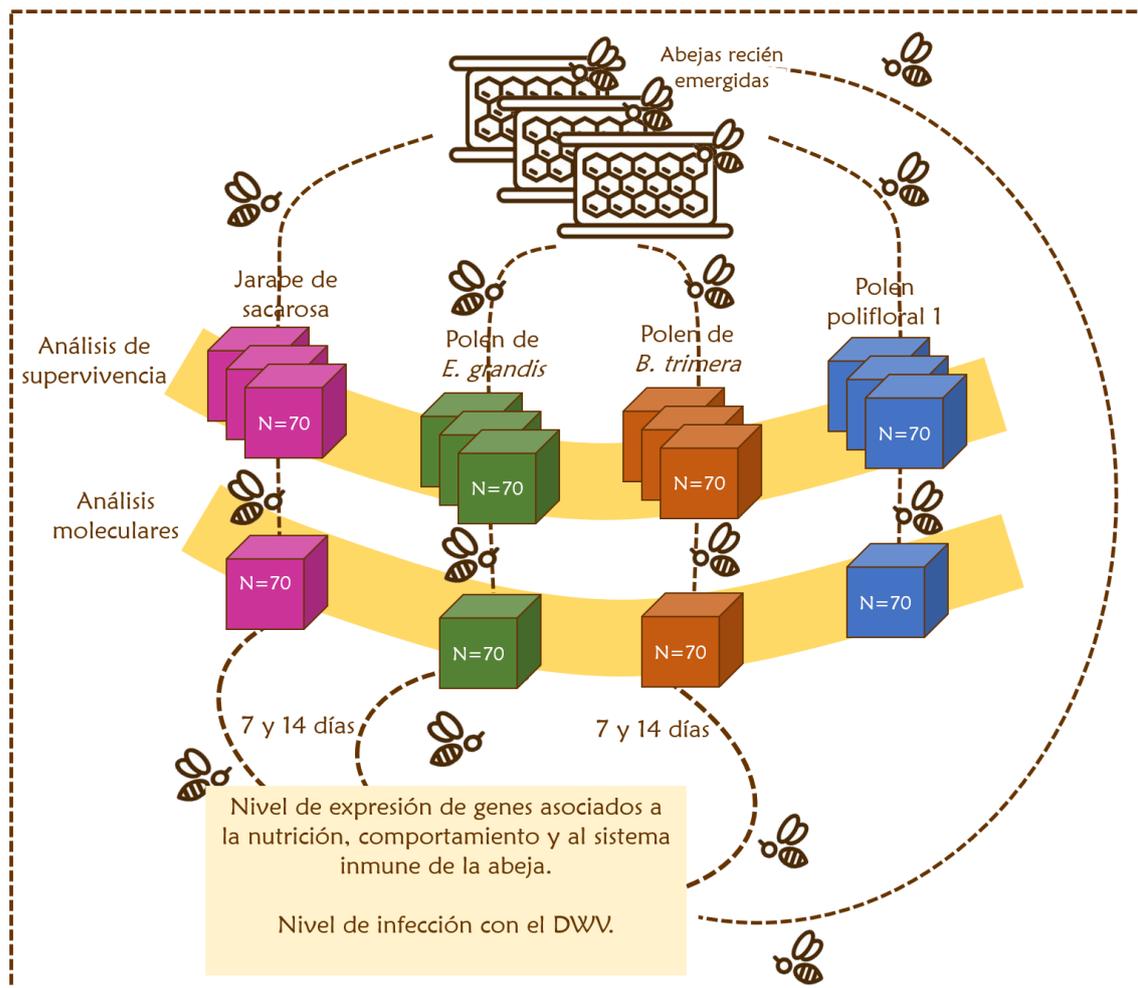


Figura 6. Esquema del diseño experimental del Ensayo 1: Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas.

5.3.3. Ensayo 2: Efecto de la nutrición en la fisiología e infección con *Nosema ceranae* y el Virus de alas deformes

Este ensayo se realizó en primavera de 2017 en el *Bee Research Laboratory* (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA), siguiendo el procedimiento detallado en el punto anterior, a excepción de que, en este caso, las abejas se colocaron en grupos de 35 abejas por jaula.

Se establecieron seis tratamientos (6 réplicas por tratamiento): i) alimentación con jarabe de sacarosa al 50% (control de estrés nutricional extremo), ii) alimentación con jarabe de sacarosa y polen de *E. grandis* 2 (dieta monofloral potencialmente pobre

desde el punto de vista nutricional), iii) alimentación con jarabe de sacarosa y polen polifloral 2 (dieta potencialmente ideal desde el punto de vista nutricional), iv) alimentación con jarabe de sacarosa al 50% e infección con *N. ceranae*, v) alimentación con jarabe de sacarosa al 50% y polen de *E. grandis* 2 e infección con *N. ceranae*. vi) alimentación con jarabe de sacarosa al 50% y polen polifloral 2 e infección con *N. ceranae*.

Las abejas pertenecientes a los grupos control de infección se alimentaron con 5 μ l de jarabe de sacarosa al 50% y se colocaron en sus respectivas jaulas. Las restantes abejas se infectaron individualmente con *N. ceranae* según se describe en la sección 5.3.6 y posteriormente se colocaron en sus jaulas. Tres jaulas por tratamiento se destinaron al análisis de supervivencia según se describe en las secciones 5.3.2 y 5.3.8. Las abejas de las restantes tres jaulas se destinaron al análisis de expresión génica, tomándose 4 abejas por jaula (total 12 abejas por tratamiento) a los 5, 10 y 15 días de vida. Las abejas colectadas se sacrificaron y almacenaron inmediatamente a -80°C hasta el momento de ser procesadas. Las abejas muertas durante el ensayo se pesaron como medida indirecta de su estado nutricional. Todas las jaulas se incubaron a 32 \pm 1°C y 70% de humedad. Las abejas se alimentaron *ad libitum* y el alimento se cambió a diario para que tuvieran alimento fresco.

El diseño experimental se esquematiza en la Figura 7.

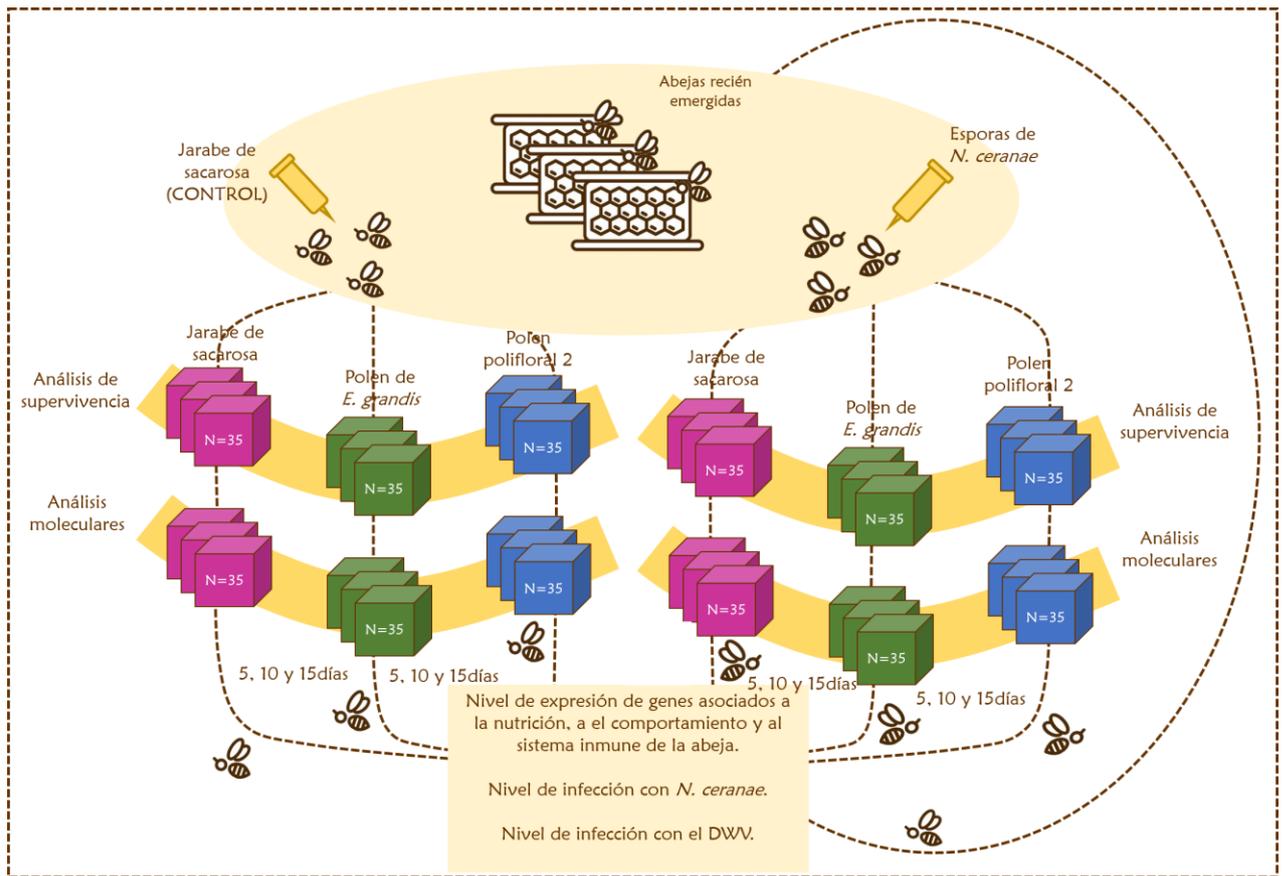


Figura 7. Esquema del diseño experimental del Ensayo 2: Efecto de la nutrición en la fisiología e infección con *Nosema ceranae* y el Virus de alas deformes

5.3.4. Purificación de esporas de *Nosema spp.*

La purificación de esporas de *Nosema spp.* se realizó por filtración (Rodríguez-García *et al.*, 2018). Para esto, se colectaron abejas en la entrada de una colonia que presentó altos niveles de infección con este microsporidio. Se extrajo el tubo digestivo de 200 abejas y el intestino medio se utilizó para la purificación de esporas. Dichos intestinos se homogeneizaron en agua destilada estéril (100 μ l por cada intestino medio), se filtraron por filtro con poros de 65 μ m y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, el sedimento obtenido se resuspendió en la misma cantidad de agua y se centrifugó a 4.200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Este último paso de lavados se repitió dos veces consecutivas. Finalmente, el sedimento obtenido se resuspendió en agua destilada estéril (50 μ l de agua por cada intestino medio). Se determinó el número de esporas mediante

microscopía óptica en cámara de Neubauer (Fries *et al.*, 2013a) y se resuspendieron para obtener una concentración de trabajo de 20.000 esporas/ μ l de agua.

5.3.5. Extracción de ADN y PCR para la identificación de *Nosema spp.*

Se analizó la especie de *Nosema* de las esporas obtenidas. Para esto, 400 μ l de la suspensión de esporas se homogeneizaron con 400 μ l de buffer CTAB y proteinasa K (200 μ g/ml) y 150 mg de perlas de vidrio a 6,5 m/s durante 45 seg en un equipo FastPrep 120 Cell Disrupter (Thermo Savant, Canadá) 5 veces consecutivas. Posteriormente, las muestras se incubaron durante toda la noche a 50°C. Al día siguiente, se añadió 1 ml de DNAzol y se homogeneizó a 6,5 m/s durante 45 seg en un equipo FastPrep 120 Cell Disrupter (Thermo Savant, Canadá) dos veces consecutivas. Se extrajo el sobrenadante y se homogeneizó con 500 μ l de etanol al 100% y glicol (1 μ g/ μ l). Posteriormente, la muestra se incubó durante 30 min a -20°C y se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento de ADN obtenido se lavó mezclándolo por inversión con 1 ml de etanol al 70% y centrifugación a 10.000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el exceso de etanol se dejó secar, para luego resuspender el ADN en 50 μ l de buffer TE 1X (Tris-HCL 20 mM, EDTA 2 mM, Tritón 1% en agua destilada estéril, pH8). Este protocolo de extracción de ADN es el comúnmente utilizado en el *Bee Research Laboratory* para la extracción de ADN de *Nosema spp.* El ADN obtenido se utilizó para determinar la especie de *Nosema spp.* Para esto se siguió el protocolo descrito por Chen y colaboradores (2009) utilizando cebadores que amplifican específicamente un fragmento del ADNr de *N. apis* (*N. apis*-F y *N. apis*-R) y otro del ADNr de *N. ceranae* (*N. ceranae*-F y *N. ceranae* R) (Tabla 1, Apéndice 1). Las condiciones de ciclado consistieron en 0,2 μ M de cada cebador, 1X buffer (Invitrogen, Brasil), 0,1 mM de dNTPs (Invitrogen, Brasil), 2 mM de MgCl₂, 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil) y 3 μ l de ADN en un volumen final de 25 μ l. El protocolo de ciclado consistió en 2 min a 94°C, 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C y 1 minuto a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X (Tris 5,4 g, ácido bórico 2,75 g, EDTA 0,5 M 2 ml por litro de agua destilada estéril pH 8) y se visualizaron mediante luz UV.

5.3.6. Infección de abejas con *Nosema ceranae*

Las abejas destinadas a los tratamientos iv, v y vi se infectaron individualmente con esporas de *N. ceranae*. Para ello, se colocaron en un recipiente en la incubadora a 32°C durante 2-3 h sin alimento de forma que tuvieran hambre al momento de la infección y consumieran el inóculo más fácilmente. Posteriormente, cada abeja se inoculó oralmente con 5 μ l de la suspensión de esporas (dosis final: 100.000 esporas/abeja). Se comprobó que las abejas consumieran todo el volumen y se colocaron en las distintas jaulas. Aquellas abejas que no consumieron el total del volumen administrado se descartaron del ensayo. Una vez que se colocaron todas las abejas en las jaulas (35), se pusieron alimentadores conteniendo jarabe de sacarosa al 50% en todas las jaulas y polen en aquellas jaulas destinadas a estas dietas. Posteriormente, las abejas se colocaron en incubadoras a 32°C para proseguir con el ensayo. El mismo protocolo se siguió para las abejas de los grupos control sin infectar, administrándoles jarabe de sacarosa al 50% en sustitución de la suspensión de esporas.

5.3.7. Procesamiento de muestras, extracción de ARN, síntesis de ADNc y extracción de ADN

5.3.7.1. Procesamiento del polen

Cada muestra de polen (0,5 gr) se homogeneizó con 1 ml de buffer TE 1X (Tris-HCL 20 mM, EDTA 2 mM, Tritón 1% en agua destilada estéril, pH8) durante 5 min. Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 23.180 rpm durante 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de buffer TE 1X repitiendo los pasos previamente descritos. La suspensión obtenida se homogeneizó en un tubo conteniendo 300 mg de perlas de cerámica a una velocidad de 6,0 m/s durante 30 seg en un equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA). El sobrenadante obtenido se utilizó para la extracción de ARN y detección de virus, mientras que el sedimento se utilizó para la extracción de ADN y detección de *N. apis* y *N. ceranae*.

5.3.7.2. Procesamiento de las abejas

Se colocó una abeja por tubo conteniendo 300 mg de perlas de cerámica y se homogeneizó con 650 μ l de Trizol (Invitrogen, USA) a una velocidad de 6,0 m/s

durante 30 seg en un equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA) 5 veces consecutivas. En el caso de las abejas tomadas en el ensayo 2, la homogenización se realizó con buffer RLT provisto por el kit de extracción, en sustitución del Trizol. Los restantes pasos, fueron compartidos entre ambos ensayos. Las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 700 μ l de cloroformo a cada tubo y se homogeneizaron nuevamente según se describe previamente por dos veces consecutivas. Las muestras se centrifugaron a 11.000 rpm durante 30 min a 4°C y posteriormente se tomó la fase acuosa superior y se homogeneizó en un nuevo tubo con 380 μ l de etanol al 70%. Dicha mezcla se utilizó para la extracción de ARN.

5.3.7.3. Extracción de ADN a partir de muestras de polen y detección de *Nosema apis* y *Nosema ceranae*

El ADN del polen se extrajo utilizando *Purelink Genomic DNA minikit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones pautadas por el fabricante. El ADN obtenido se utilizó como molde para la amplificación mediante multiplex PCR utilizando cebadores específicos para un fragmento del operón ribosomal 16S de *N. apis* y *N. ceranae* (Martín-Hernandez *et al.*, 2007). Para la identificación de *N. ceranae* se emplearon los cebadores 218MITOC-F y 218MITOC-R, mientras que para *N. apis* se emplearon los cebadores 321APIS-F y 321 APIS-R (Tabla 1, Apéndice 1). La mezcla de reacción consistió en 0,4 μ M de cada cebador, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 2 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), buffer 1X y 2,5 μ l de ADN en un volumen final de 25 μ l. En cada reacción se incluyó un control negativo en el cual se empleó agua destilada estéril en lugar del ADN y controles positivos para ambos microsporidios. Las condiciones de ciclado consistieron en 1 min a 94°C, 10 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 61,8°C, 45 seg a 72°C, 20 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 61,8°C, 50 seg a 72°C con una extensión de 5 seg en cada ciclo, y por último 7 min a 72°C. Las reacciones se realizaron en un termociclador *MultiGene OptiMax Thermal Cycler* (Labnet International, USA). Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0,5X (Tris 5,4 g, ácido bórico 2,75 g, EDTA 0,5 M 2 ml por litro de agua destilada estéril pH 8) a 130 V durante 30-40 min, se tiñeron con GelRed (Biotium, USA) y se visualizaron mediante luz UV.

5.3.7.3. Extracción de ARN y síntesis de ADNc a partir de muestras de polen y de abejas

La extracción de ARN a partir de la muestra de polen se realizó empleando el *Pure link RNA/DNA Mini kit* (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante. EL ARN obtenido se utilizó como molde para la síntesis de ADNc empleando el *High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Lituania), según las recomendaciones del fabricante.

La extracción de ARN a partir de las muestras de abejas se realizó utilizando el *RNeasy Mini kit* (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones pautadas por el fabricante e incorporando un paso de digestión del ADN genómico en la columna utilizando DNAsa I (Invitrogen, USA). EL ARN obtenido (1 μ g) se utilizó para la síntesis de ADNc utilizando *M-MLV Reverse Transcriptase* (Life Technolgies, USA) (40U), *RNAse inhibitor* (Applied Biosystems, Lituania) (25U), hexámeros randómicos (Invitrogen, USA) (2.5 uM) y dNTPs (Life Technolgies, USA) (0.8 mM) en un volumen final de reacción de 25 μ l. Las condiciones de ciclado para la síntesis del ADNc fueron 10 min a 25°C, 45 min a 48°C y 5 min a 70°C. El ADNc obtenido se diluyó en 100 μ l de buffer Tris-HCl (10 mM Tris HCl pH 8.5) y se conservó a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

5.3.7.4. PCR en tiempo real para la detección de virus en el polen

Se analizó la presencia de los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV en las muestras de polen mediante PCR en tiempo real, utilizando los cebadores ABPV-F y R, BQCV F y R, DWV F y R y SBV F y R (Tabla 1, Apéndice 1). Las reacciones de PCR consistieron en 10 μ l de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, UK), 0,3 μ M de cada cebador y 2 μ l de cDNA en un volumen final de 20 μ l. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 16 seg a 95°C, 30 seg a 50°C (a excepción del SBV que cuyos cebadores tienen una temperatura de *annealling* de 46°C) y 30 seg a 60°C. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR System (Biorad). Como control positivo se empleó ADNc proveniente de abejas naturalmente infectadas con estos virus.

5.3.7.5. PCR en tiempo real para el análisis de expresión génica y niveles de infección con *Nosema ceranae* y DWV

Se analizó la expresión de genes asociados al estado nutricional y al comportamiento de las abejas, genes vinculados a su estado inmunológico y se determinaron los niveles de infección con *N. ceranae* y el DWV. Para analizar los genes vinculados al estado nutricional y al comportamiento se escogieron los genes *vitelogenina (vg)*, *proteína mayor 1 de la jalea real (mrjp1)* y *metil fernesolato epoxidasa (mfe)* (en ambos ensayos). La *mfe* cataliza el último paso de síntesis de la hormona juvenil y es un marcador útil para medir los niveles de esta hormona (Helvig *et al.*, 2004). Por otro lado, se analizó la expresión de los genes que codifican para la *defensina 1 (def1)* (ensayo 2), *dorsal (dor)* (ensayo 2) e *himenoptecina (him)* (ensayo 1 y 2) como representantes de la inmunidad humoral y *de la pro-fenol oxidasa (ppo)* (ensayos 1 y 2) y el *activador de la pro-fenol oxidasa (ppo-act)* (ensayo 2) como representantes de la inmunidad celular de las abejas. La expresión de dichos genes y los niveles de infección con *N. ceranae* (ensayo 2) y DWV (ensayos 1 y 2) se analizó mediante PCR en tiempo real. En todos los casos, la mezcla de reacción consistió en 5 μ l de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, UK), 0.3 μ M de cada cebador y 2 μ l de ADNc en un volumen final de 10 μ l. Los cebadores utilizados fueron vg-F y R, mrjp1-F y R, mfe-F y R, def1-F y R, dor-F y R, him-F y R, ppo-F y R, ppo-act-F y R, DWV-F y R y Ncer-F y R (Tabla 1, Apéndice 1). Las condiciones de ciclado consistieron en 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Con el fin de comprobar la identidad de los productos se incluyó una curva de desnaturalización elevando la temperatura de 65 a 95°C. Todas las muestras se analizaron por triplicado, incluyendo una curva estándar de 6 puntos de dilución 1/5 de una mezcla de ADNc y controles negativos. Para cada muestra se analizó también la expresión del gen de la proteína ribosomal S5 (RPS5) (Tabla 1, Apéndice 1), gen de expresión constitutiva de las abejas. La expresión de dicho gen se utilizó para normalizar los resultados y se analizó en cada placa junto con cada gen de interés. El segundo punto de la curva estándar se utilizó como intercalibrador entre placas. Todas las corridas se realizaron en un equipo de PCR en tiempo real ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Los resultados obtenidos en ambos experimentos se analizaron utilizando el método descrito por Pfaffl (2001), utilizando como grupo calibrador a las abejas muestreadas a tiempo 0 (recién emergidas).

5.3.8. Análisis estadísticos

5.3.8.1. Análisis de supervivencia

Se construyeron curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier considerando los registros de abejas muertas (Bland & Altman, 1998). Las diferencias en la supervivencia entre los distintos tratamientos se analizaron mediante el test Logrank y Wilcoxon *a posteriori* corregido por Bonferroni (Bland & Altman, 2004).

5.3.8.2. Consumo de polen

El efecto de las dietas en el consumo de polen se analizó mediante Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) con pendiente e intercepto aleatorio considerando el consumo de polen como variable de respuesta, la dieta como efecto fijo y los días como efecto aleatorio (paquete {lme4}) (Bates *et al.*, 2015; R Studio Team, 2016).

5.3.8.3. Peso diario de las abejas

Con el fin de analizar la diferencia en el peso de las abejas pertenecientes a los distintos tratamientos, se consideraron las abejas muertas de cada tratamiento durante todo el ensayo. Debido a que los datos no cumplieron con los supuestos básicos de estadística paramétrica (normalidad y homogeneidad de varianza), la diferencia entre tratamientos se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney *a posteriori* (paquete {agricolae}) (R Studio Team, 2016; Mendiburu, 2017).

5.3.8.4. Expresión génica y nivel de infección

Con el objetivo de analizar el efecto de los distintos tratamientos en la expresión de distintos genes vinculados a la fisiología de las abejas y el nivel de infección con el DWV y *N. ceranae* se llevaron a cabo dos abordajes. Para el caso del Ensayo 1, se utilizó estadística clásica, ya que 1) las abejas fueron tomadas de la misma jaula y por lo tanto no fue necesario considerar el “efecto jaula”, y 2) se muestrearon solamente a dos tiempos y la interpretación y visualización de los resultados fue más sencilla. Se analizó en una primera instancia el ajuste de los datos a los supuestos básicos de estadística

paramétrica (normalidad y homogeneidad de varianza) mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov corregido por Lillieford y el test de Levene, respectivamente (paquetes {nortest} y {car}) (Fox, 2016; R Studio Team, 2016). Aquellos datos que cumplieron con los supuestos de estadística paramétrica se analizaron mediante el test de ANOVA y Scheffée *a posteriori*, mientras que aquellos datos que no se ajustaron a los supuestos de estadística paramétrica se analizaron mediante el test de Kruskal Wallis y Mann Whitney *a posteriori* (paquete {agricolae}) (R Studio Team, 2016; Mendiburu, 2017). Se analizó la asociación entre la expresión de los genes analizados considerando los distintos tratamientos mediante el test de correlación de rangos de Spearman (paquete {agricolae}) (R Studio Team, 2016; Mendiburu, 2017).

Para el caso del ensayo 2, se utilizaron Modelos lineares generalizados mixtos (GLMM) para analizar el efecto de los tratamientos y el tiempo en las distintas variables y considerar el “efecto jaula” (ya que se tomaron 4 abejas por jaula, de 3 jaulas). El nivel de expresión de los genes y la infección con DWV se analizaron como variables de respuesta, el tipo de dieta (jarabe, polen polifloral 2 o polen de *E. grandis* 2), el tiempo (día 5, 10 y 15), y la infección con *N. ceranae* (infectadas o no infectadas) como efectos fijos, y la jaula (1, 2 o 3) como efecto aleatorio. Para el análisis del nivel de infección con *N. ceranae*, se utilizaron estos datos como variable de respuesta, el tipo de dieta y el tiempo como efectos fijos y las jaulas como efectos aleatorios. Para todos estos análisis se utilizó la distribución gamma y la función de conexión log.

En todos los casos se consideró un nivel de confianza del 95% y se usó el software R Studio (R Studio Team, 2016).

5.4. Resultados

5.4.1. Dietas utilizadas en los ensayos

Con el fin de obtener el polen a utilizar en los ensayos de laboratorio se realizaron dos colectas de polen polifloral (1 y 2), dos colectas de polen de *E. grandis* (1 y 2) y una colecta de polen de *B. trimera*.

El análisis palinológico mostró que el polen colectado como polifloral 1 estuvo compuesto por 23 especies botánicas distintas (Tabla 1). La muestra de polen polifloral 2 estuvo compuesta por 17 especies botánicas distintas (Tabla 1). Si bien hubo una especie mayoritaria (*Lotus* spp.), el porcentaje de este polen en la muestra fue de 43,9% por lo que igualmente puede considerarse polifloral. El polen colectado como polen de *E. grandis* 1, 2 y *B. trimera* pueden considerarse monoflorales ya que estuvieron compuestos por un 97,2% y 94,2% de polen de *E. grandis* y 75,1% de polen de *B. trimera*, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Origen botánico del polen utilizado en los ensayos

Familia	Nombre científico	Polen	Polen	Polen de	Polen de	Polen de
		polifloral 1	polifloral 2	<i>E. grandis</i> 1	<i>E. grandis</i> 2	<i>B. trimera</i>
		%	%	%	%	%
Myrtaceae	<i>E. grandis</i> .	3,5	9,4	97,2	94,2	1,8
Asteraceae	<i>Baccharis</i> spp. 1	0,2	7,3	2,1	1,3	-
Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	-	-	-	-	75,1
Asteraceae	<i>Baccharis</i> spp. 2	-	3,1	-	0,4	-
Asteraceae	<i>Soliago chilensis</i>	0,5	-	0,5	-	0,5
Asteraceae	<i>Senecio</i> spp.	-	1,6	-	1,4	0,1
Fabaceae	<i>Trifolium pratense</i>	22,5	8,8	0,2	-	2
Anacardiaceae	<i>Schinus longifolius</i>	0,1	-	-	-	8,5
Rhamnaceae	<i>Scutia buxifolia</i>	0,1	-	-	-	4,3
Apiaceae	<i>Eryngium</i> spp.	6,7	0,7	-	-	0,5
Paoceae	-	1,3	-	-	-	2,5
Paoceae	<i>Sorghum</i> spp.	-	3,7	-	-	-
Asteraceae	<i>T. Eupatorium bunifolium</i>	0,5	4,9	-	1,5	0,1
Asteraceae	<i>T. cirsium vulgare</i>	0,2	-	-	-	2,4
Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	-	1,6	-	-	-
Asteraceae	<i>T. Cynara cardunculus</i>	-	0,6	-	-	-
Scrophulariaceae	-	0,2	-	-	-	2,1
Liliaceae	-	-	0,8	-	-	0,1
Fabaceae	<i>Lotus</i> spp.	36,1	43,9	-	-	-
Apiaceae	<i>Ammi viznaga</i>	2,9	-	-	-	-
Ch-Am	-	0,1	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	3	9,4	-	-	-
Fabaceae	<i>Trifolium rapens</i>	11,1	-	-	-	-
Unknown	-	2	-	-	-	-
Amaryllidaceae	<i>Allium cepa</i>	0,7	-	-	-	-
Arecaceae	-	2,1	-	-	-	-
Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i>	0,2	-	-	-	-
Lamiaceae	<i>Salvia</i> spp.	0,1	0,7	-	-	-
Oxalidaceae	<i>Oxalis</i> spp.	-	0,4	-	1,2	-
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	5,1	0,8	-	-	-
Onagraceae	<i>Ludwigia peploides</i>	0,8	-	-	-	-
Desconocido	-	-	2,3	-	-	-

El porcentaje de proteína cruda del polen polifloral 1 fue de 26,31%, el del polen polifloral 2 fue del 25,21%, el del polen de *E. grandis* 1 fue de 23,65%, el del polen de *E. grandis* 2 fue del 26,42% y el del polen de *B. trimera* fue de 25,38%. Por otro lado, el porcentaje de lípidos del polen polifloral 1 fue de 3,72%, el del polen polifloral 2 fue de 4,23%, el del polen de *E. grandis* 1 fue de 1,44%, mientras que el contenido de lípidos del polen de *E. grandis* 2 fue de 1,67%.

El contenido de aminoácidos de los distintos pólenes se presenta en la Tabla 2. No se observan grandes diferencias en la proporción de aminoácidos esenciales entre las distintas muestras de polen.

Tabla 2. Porcentaje de aminoácidos con respecto al total de materia seca en el polen polifloral 1, 2, y polen de *E. grandis* 1 y 2. Se destacan en gris los aminoácidos esenciales para las abejas.

Porcentaje de aminoácidos (sobre el total de materia seca del polen analizado)				
Aminoácido	Polen polifloral 1	Polen polifloral 2	Polen de <i>E. grandis</i> 1	Polen de <i>E. grandis</i> 2
Ácido aspártico	1,92	1,87	1,69	2,03
Ácido Glutámico	1,79	1,96	1,88	2,01
Serina	0,99	0,98	0,94	1
Glicina	0,81	0,86	0,9	0,93
Histidina	0,45	0,46	0,44	0,46
Taurina	0,03	no detectado	0,05	0,04
Arginina	0,94	1,17	1,18	1,26
Treonina	0,88	0,77	0,73	0,79
Alanina	1,07	1	1,05	1,08
Prolina	2,33	2,3	2,21	2,24
Tirosina	0,65	0,67	0,6	0,65
Valina	0,94	0,89	0,91	1,01
Metionina	0,33	0,33	0,34	0,38
Cisteína	0,21	0,22	0,21	0,21
Isoleucina	0,87	0,77	0,77	0,86
Leucina	1,37	1,35	1,31	1,4
Fenilalanina	0,75	0,84	0,73	0,77
Lisina	1,07	1,16	1,24	1,14
Triptofano	0,22	0,27	0,15	0,18

Por otro lado, debido a que el polen puede ser vehículo de diferentes patógenos e infectar a las abejas, se analizó la presencia de *N. apis*, *N. ceranae* y de los ABPV, BQCV, DWV y SBV en las muestras de polen, no detectándose ninguno de estos patógenos (resultados no mostrados).

Por último, se analizó la presencia de 33 pesticidas en la muestra de polen polifloral 1, detectándose seis de ellos: atrazina, azoxistrobin, carbendazim, cumafós, piraclostrobin y tebuconazole. Las concentraciones encontradas fueron todas cercanas al límite de detección de la técnica (Tabla 3).

Tabla 3. Pesticidas de uso común en agricultura y apicultura analizados en el polen polifloral 1, concentraciones detectadas, límite de detección de la técnica para cada uno de ellos y número de veces menor a la DL50 en abejas que consumieron el químico durante 48 h. ND: no detectado; LOQ: límite de cuantificación de la técnica para ese químico. Fuente: (Agriculture & Environment Research Unit. University of Hertfordshire, 2007).

Pesticida	Concentración (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Número de veces menor a la DL50 luego de 48hs de consumo
Acetamiprid	ND	0,001	-
Atrazina	<LOQ	0,001	2 x 10 ⁶
Azoxistrobin	0,0063	0,0001	7 x 10 ⁵
Boscalid	ND	0,001	-
Carbarilo	ND	0,001	-
Carbendazim	0,0113	0,0001	1 x 10 ⁵
Clothianidin	ND	0,0001	-
Cipermetrina	ND	0,1	-
Clorfeninfos (Z+E)	ND	0,05	-
Clorotalonil	ND	0,1	-
Clorpirifós-etil	ND	0,05	-
Clorpirifós-metil	ND	0,05	-
Cumafós	0,035	0,0001	2 x 10 ⁵
Diazinon	ND	0,05	-
Dimetoato	ND	0,001	-
Endosulfan sulfato	ND	0,005	-
Fipronil	ND	0,05	-
Haloxifop metil	ND	0,001	-
Hexytiadox	ND	0,001	-
Imazalil	ND	0,001	-
Imidacloprid	ND	0,001	-
Iprodina	ND	0,001	-
Lambda cialotrina	ND	0,05	-
Metomilo	ND	0,001	-
Metidation	ND	0,1	-
p,p-DDE	ND	0,05	-
p,p-DDT	ND	0,05	-
Piraclostrobin	<LOQ	0,001	2 x 10 ⁶
Tau-Fluvalinato	ND	0,05	-
Tebuconazole	0,005	0,001	9 x 10 ⁵
Tiacloprid	ND	0,001	-
Tiametoxam	ND	0,001	-
Trifluralin	ND	0,1	-

5.4.2. Ensayo 1: Efecto de la nutrición en la fisiología de las abejas y en los niveles de infección con el DWV

5.4.2.1. Supervivencia diaria

Durante el transcurso del experimento se cuantificaron las abejas muertas y se construyeron curvas de supervivencia para los distintos tratamientos. Las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* y *B. trimera* fueron las que presentaron mayor supervivencia, no habiendo diferencias estadísticamente significativas en este parámetro entre ambos grupos (Wilcoxon Test Jarabe - *E. grandis* $p=0,002$; Jarabe - *B. trimera* $p\leq 0,001$; Polen polifloral 1 - *E. grandis* $p=0,02$; Polen polifloral 1 - *B. trimera* $p\leq 0,001$; *E. grandis* - *B. trimera* $p=0,99$) (Fig. 8). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia diaria acumulada de las abejas alimentadas solamente con jarabe de sacarosa (control) y las alimentadas con jarabe de sacarosa y polen polifloral 1 (Wilcoxon Test $p=0,97$) (Fig. 8). En particular, las abejas alimentadas solo con jarabe de sacarosa sobrevivieron bien los primeros días de ensayo, pero vivieron máximo 25 días, mientras que las abejas alimentadas con polen polifloral 1 mostraron muy baja supervivencia en los primeros días del ensayo (más del 50% de las abejas murieron en los primeros 5-6 días del ensayo), pero la supervivencia máxima llegó a los 45 días.

La alta mortalidad en la primera etapa de vida de las abejas alimentadas con polen polifloral 1 fue inesperada, por lo que el ensayo se repitió tres veces, obteniéndose siempre el mismo resultado. Por tal motivo, no se realizaron los estudios moleculares de las abejas pertenecientes a este tratamiento y se diseñaron los ensayos del capítulo 2 de esta tesis, con el fin de profundizar en las posibles causas por las cuales dicho polen podría haber generado tan alta mortalidad.

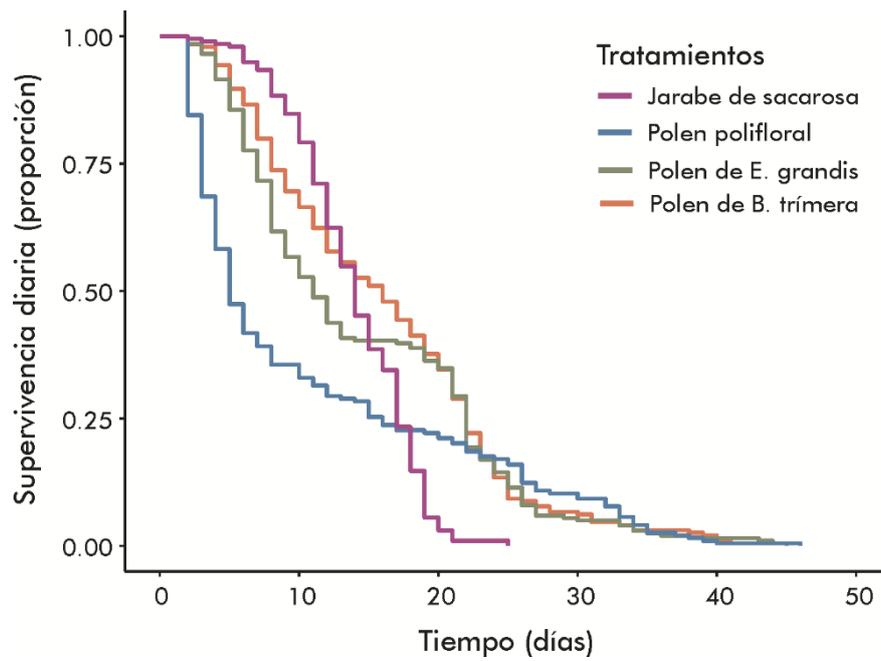


Figura 8. Supervivencia diaria acumulada de las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa, polen polifloral 1, polen monofloral de *Eucalyptus grandis* y polen monofloral de *Baccharis trimera*. La curva de supervivencia se construyó mediante el método de Kaplan Meier.

5.4.2.2. Consumo de polen

Las abejas consumieron polen principalmente en la primera etapa de vida y dicho consumo disminuyó progresivamente luego de los cinco días de vida (Fig. 9). Las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* consumieron significativamente menos cantidad de polen en comparación a las alimentadas con polen polifloral (GLMM, Valor del intercepto: 2,23; Valor del coeficiente: -0,09; $p \leq 0,001$), mientras que las abejas que consumieron polen de *B. trimera* consumieron significativamente mayor cantidad de polen en relación a las abejas alimentadas con polen polifloral (GLMM, Valor del intercepto: 2,23; Valor del coeficiente: 0,05; $p \leq 0,001$) (Fig. 9).

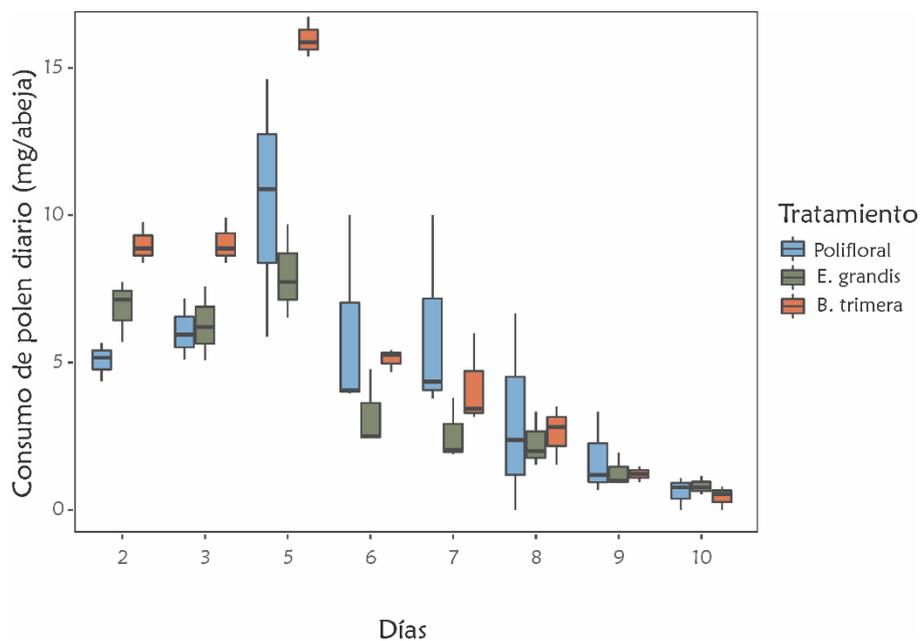


Figura 9. Consumo de polen diario (mg/abeja) de las abejas alimentadas con el polen polifloral 1, polen monofloral de *Eucalyptus grandis* y de *Baccharis trimera*. Se presenta la media y desvío estándar del consumo de polen de las abejas correspondientes a cada tratamiento por día. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

5.4.2.3. Expresión de genes vinculados a la fisiología de las abejas

Se analizó el efecto de las dietas en la expresión de diferentes marcadores del estado nutricional, de comportamiento, del estado inmunitario y el nivel de infección con el DWV.

Los niveles de expresión del gen que codifica para la Vg fueron mayores a los 7 días de edad en abejas alimentadas con polen en comparación a las alimentadas solo con jarabe de sacarosa, y a las recién emergidas (Mann Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). No se observaron diferencias en la expresión de *vg* entre las abejas alimentadas con ambos tipos de pólenes (Mann Whitney, $p \geq 0,05$) (Tabla 1, Apéndice 2). A los 14 días de edad, el nivel de expresión de este gen disminuyó en las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* (Mann Whitney, $p \leq 0,05$), mientras que se mantuvo constante en las alimentadas con polen de *B. trimera* (Mann Whitney, $p \geq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). El nivel de expresión de este gen en las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa aumentó significativamente entre los 7 y 14 días de edad (Mann Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2).

Los niveles de expresión de *mrjp1* fueron similares a los observados con la *vg* a excepción del encontrado en las abejas recién emergidas. Dichos niveles fueron altos y similares a los encontrados en las abejas de 7 días de edad alimentadas con polen (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). Por otro lado, los niveles de *mrjp1* disminuyeron significativamente a los 7 días en las abejas que recibieron jarabe de sacarosa como única fuente de alimento, siendo inferior a los niveles encontrados en las abejas alimentadas con polen en esta etapa de vida (Scheffé $p \leq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). A los 14 días de edad, los niveles de expresión de *mrjp1* en las abejas alimentadas con polen tendieron a disminuir principalmente en las abejas alimentadas con polen de *E. grandis*, pero dicha disminución fue marginalmente significativa, mientras que en las abejas alimentadas con polen de *B. trimera* estos niveles de mantuvieron constantes (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). En el caso de las abejas alimentadas con jarabe, los niveles de expresión de este gen no cambiaron entre los 7 y 14 días de edad (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). Las abejas de 14 días alimentadas con polen de *B. trimera* presentaron mayor nivel de expresión de *mrjp1* en comparación a las alimentadas con jarabe (Scheffé $p \leq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2).

Los niveles de expresión de *mfe* aumentaron en abejas alimentadas con jarabe de sacarosa de 7 días de edad en comparación a las recién emergidas, siendo superiores a los encontrados en las alimentadas con polen en esta etapa de vida (Mann Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). Dichos niveles de mantuvieron constantes hacia los 14 días de vida en abejas alimentadas con jarabe (Mann Whitney, $p \geq 0,05$), mientras que aumentaron en las alimentadas con polen (Mann Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2). En este punto de muestreo, las abejas alimentadas con polen de *B. trimera* fueron las que presentaron mayor nivel de expresión de *mfe* en comparación con los restantes tratamientos (Mann Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 10; Tabla 1, Apéndice 2).

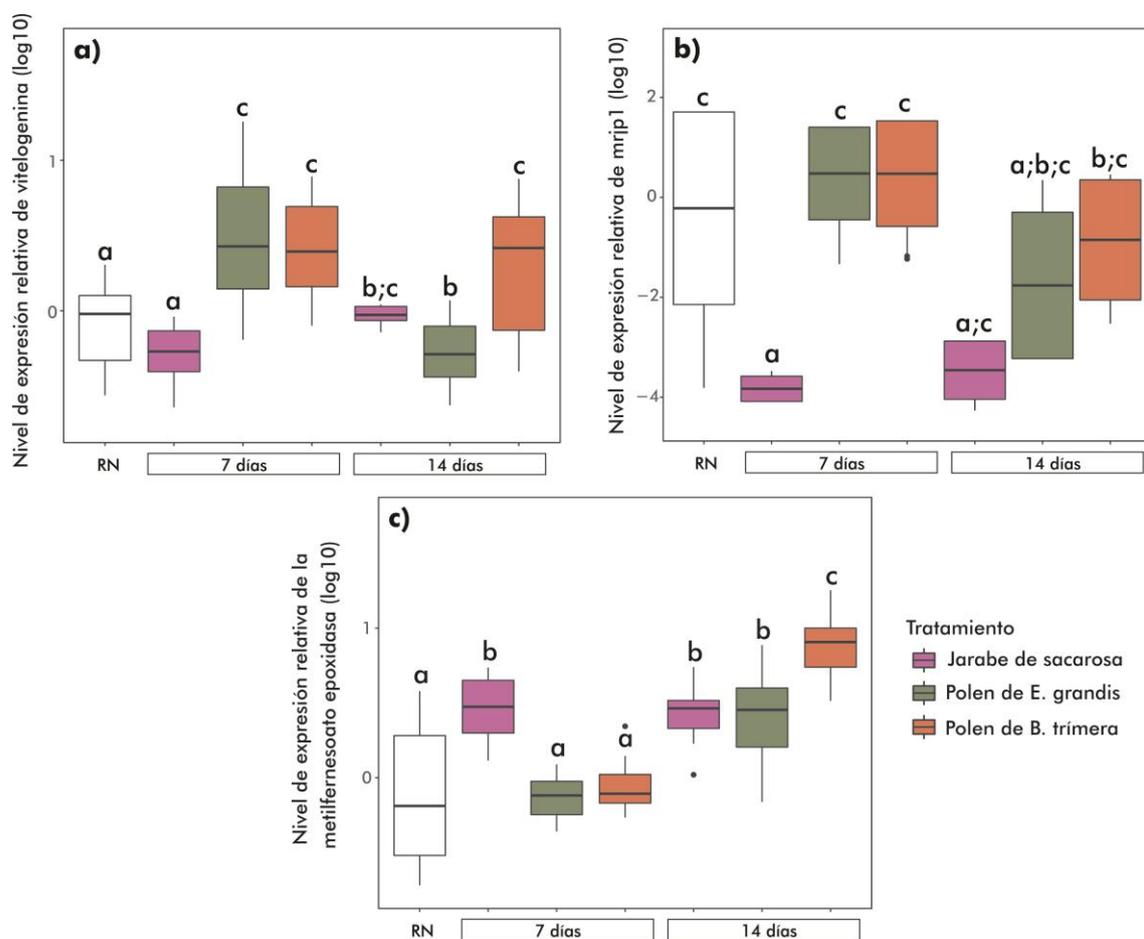


Figura 10. Expresión relativa de los genes a) *vgl*, b) *mrjp1* y c) *mfe* de las abejas muestreadas a tiempo 0 (RN: recién nacidas/emergidas) y a los 7 y 14 días de edad alimentadas con jarabe de sacarosa, polen monofloral de *Eucalyptus grandis* y de *Baccharis trimera*. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

Los niveles de expresión del *him* fueron similares en abejas recién emergidas y en las abejas de 7 días de edad alimentadas con distintas dietas (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 11; Tabla 1, Apéndice 2). Dichos niveles aumentaron hacia los 14 días de edad en las abejas de los distintos tratamientos, siendo este aumento estadísticamente significativo únicamente en las alimentadas con jarabe de sacarosa (Scheffé $p \leq 0,05$) (Fig. 11; Tabla 1, Apéndice 2). A los 14 días de edad los niveles de *him* fueron similares para las abejas de todos los tratamientos (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 11; Tabla 1, Apéndice 2).

Los niveles de expresión de la *ppo* se comportaron similar a los de la *him* en la primera etapa de vida: similares niveles de expresión de este gen en abejas recién emergidas y en abejas de 7 días de edad alimentadas con las distintas dietas (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 11; Tabla 1, Apéndice 2). Hacia los 14 días de edad, los niveles de expresión de este gen aumentaron en las abejas alimentadas con polen de *B. trimera* (Scheffé $p \leq 0,05$) (Fig. 11; Tabla 1, Apéndice 2), y se mantuvo constante en las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa y con polen de *E. grandis* (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 11; Tabla 1, Apéndice 2).

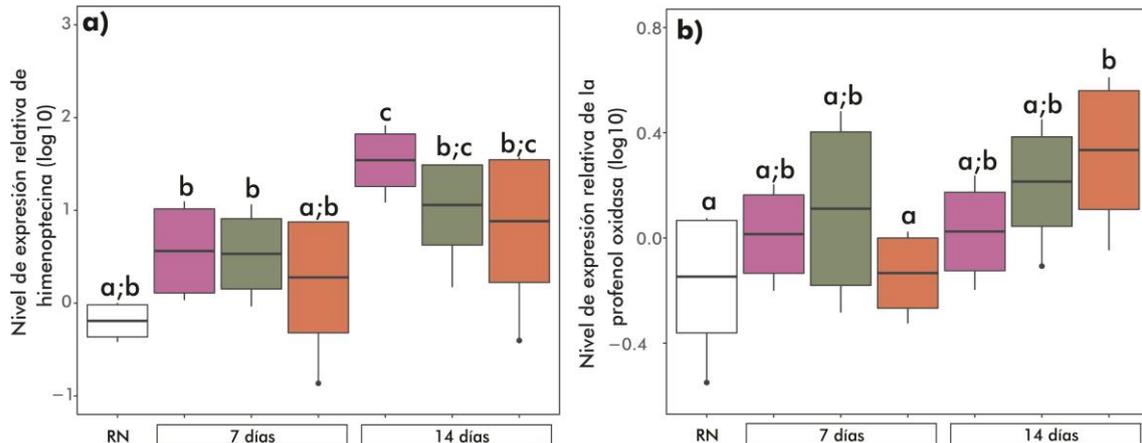


Figura 11. Expresión relativa de los genes a) *him* y b) *ppo* de las abejas muestreadas a tiempo 0 (RN: recién nacidas/emergidas) y a los 7 y 14 días de edad alimentadas con jarabe de sacarosa, polen monofloral de *Eucalyptus grandis* y de *Baccharis trimera*. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

En resumen, las distintas dietas afectaron la expresión de los genes vinculados a la nutrición y a la división de labores, pero no tuvo un efecto significativo en la expresión de los genes vinculados al sistema inmune analizados.

5.4.2.4. Nivel de infección con el DWV

Los niveles de infección con el DWV aumentaron significativamente entre las abejas recién emergidas y las de 7 días de edad de los distintos tratamientos y luego se mantuvieron constantes (Scheffé $p \geq 0,05$) (Fig. 12; Tabla 1, Apéndice 2). Tanto las abejas de 7 como de 14 días de edad alimentadas con polen tendieron a presentar mayores niveles de infección con este virus en comparación a las alimentadas con jarabe de sacarosa, pero debido a la gran variabilidad de los datos de las abejas alimentadas con polen de *B. trimera*, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 12; Tabla 1, Apéndice 2).

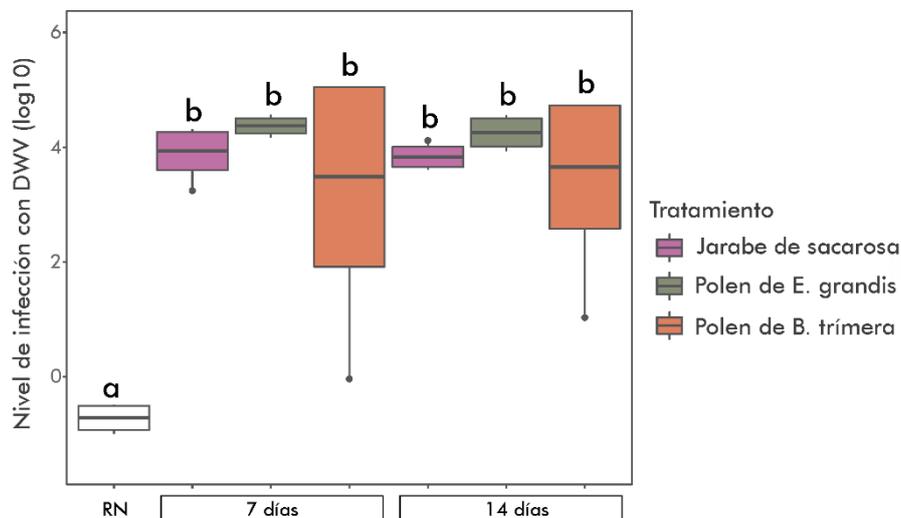


Figura 12. Nivel de infección con el Virus de alas deformes (DWV) de las abejas muestreadas a tiempo 0 (RN: recién nacidas/emergidas) y a los 7 y 14 días de edad alimentadas con jarabe de sacarosa, polen monofloral de *Eucalyptus grandis* y de *Baccharis trimera*. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

5.4.2.5. Asociación entre los niveles de expresión génica

Se analizó la asociación entre los niveles de expresión de los genes vinculados a la nutrición y comportamiento entre sí y con los vinculados a la respuesta inmune. En las abejas alimentadas con jarabe se encontró una asociación positiva entre los niveles de *vg* e *him*, por lo que ambas variables presentaron un mismo comportamiento (Fig. 13; Tabla 2, Apéndice 2). En el caso de las abejas alimentadas con polen de *E. grandis*, los marcadores vinculados al estado nutricional y comportamental mostraron una asociación positiva entre los niveles de *vg* y *mrjp1* y negativa entre *vg* y *mfe* (Fig. 13; Tabla 2, Apéndice 2). Además, los niveles de *vg* y *mrjp1* se asociaron negativamente con los de *him*, por lo que a medida que los niveles de estos marcadores nutricionales disminuyeron, los de *him*, aumentaron (Fig. 13; Tabla 2, Apéndice 2). Una relación similar se observó entre *mrjp1* e *him* y *ppo* en las abejas alimentadas con polen de *B. trimeria* (Fig. 13; Tabla 2, Apéndice 2). Además, en este grupo de abejas, a medida que disminuyeron los niveles de *mrjp1*, los de *mfe* aumentaron. Estos niveles de *mfe* mostraron una asociación positiva con los de *ppo*, aumentando a lo largo de la vida de las abejas (Fig. 13; Tabla 2, Apéndice 2).

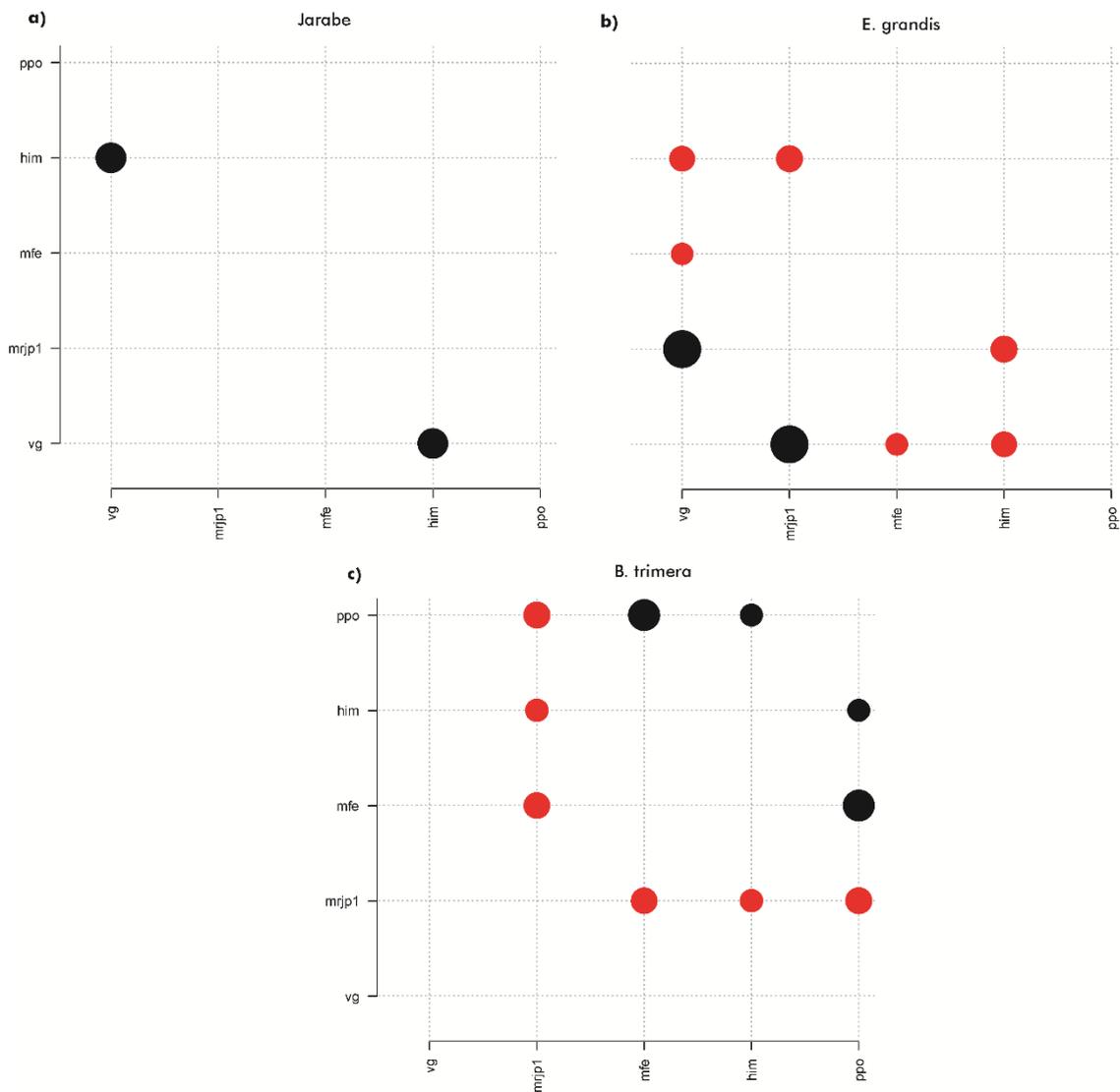


Figura 13. Gráfico de burbujas representando la asociación entre los niveles de expresión de los genes *vg*, *mrip1*, *mfe*, *him* y *ppo* en abejas alimentadas con jarabe (a), polen de *Eucalyptus grandis* (b) y polen de *Baccharis trimera*. El tamaño de los círculos representa el valor del coeficiente R obtenido a partir de la correlación de Spearman para aquellas asociaciones que presentaron un p valor $\leq 0,05$. Los círculos negros indican asociación positiva mientras que los círculos rojos indican una asociación negativa.

5.4.3. Ensayo 2: Efecto de la nutrición en la fisiología e infección con *Nosema ceranae* y el Virus de alas deformes

5.4.3.1. Esporas de *Nosema* spp. utilizadas para los ensayos de infección

Con el fin de determinar la especie de las esporas de *Nosema* utilizadas en los ensayos de infección se extrajo el ADN de las mismas y se analizó su identidad mediante PCR. Los productos de amplificación fueron de 250 pb, correspondiente a *N. ceranae* (resultados no mostrados).

5.4.3.2. Supervivencia diaria

Las abejas pertenecientes a los grupos control (sin infección con *N. ceranae*) presentaron mayor supervivencia que las abejas pertenecientes a los grupos infectados, independientemente de la dieta recibida (Wilcoxon Test Jarabe - Jarabe + *N. ceranae* $p \leq 0,001$; polen polifloral - polen polifloral + *N. ceranae* $p \leq 0,001$; polen de *E. grandis* - polen de *E. grandis* + *N. ceranae* $p = 0,005$) (Fig. 14). Por otro lado, las abejas alimentadas con polen (tanto infectadas como no infectadas con *N. ceranae*) sobrevivieron significativamente más que las alimentadas solamente con jarabe (Wilcoxon Test Jarabe - polen polifloral $p \leq 0,001$; Jarabe - polen de *E. grandis* $p = 0,005$; Jarabe + *N. ceranae* - polen polifloral + *N. ceranae* $p \leq 0,001$; Jarabe + *N. ceranae* - polen de *E. grandis* + *N. ceranae* $p \leq 0,001$) (Fig. 14). No se observaron diferencias en la supervivencia diaria acumulada de las abejas alimentadas con ambas dietas polínicas, ya sea infectadas con *N. ceranae* o sin infectar (Wilcoxon Test polen polifloral - polen de *E. grandis* $p = 0,2$; polen polifloral + *N. ceranae* - polen de *E. grandis* + *N. ceranae* $p = 0,13$) (Fig. 14).

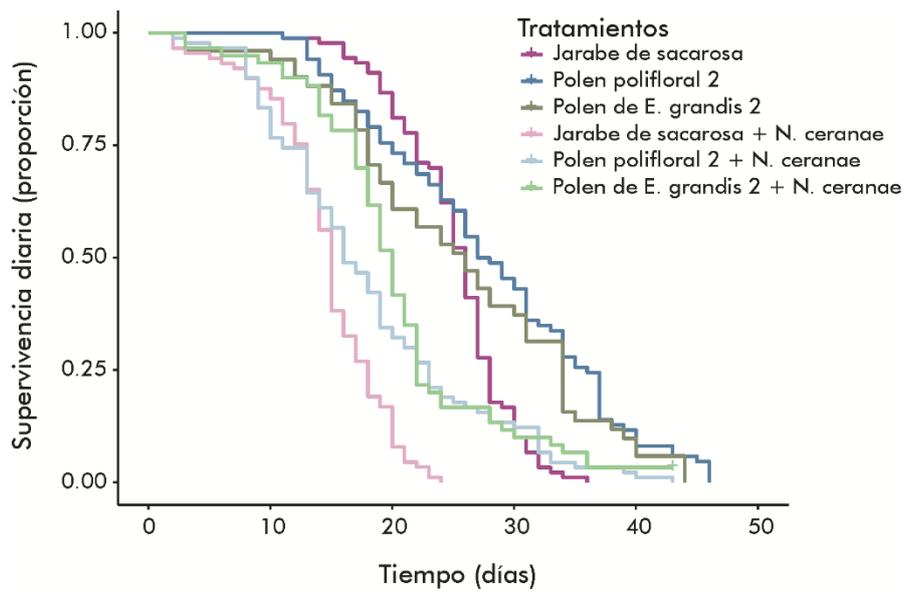


Figura 14. Supervivencia diaria acumulada de las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa, polen polifloral 2 y polen de *Eucalyptus grandis* 2 e infectada con *Nosema ceranae* y alimentadas con estas dietas. La curva de supervivencia se construyó mediante el método de Kaplan-Meier.

5.4.3.3. Peso diario de las abejas

Las abejas alimentadas con polen presentaron mayor peso que las alimentadas con jarabe (Mann Whitney jarabe – polen polifloral 2 $p \leq 0,001$; jarabe – *E. grandis* 2 $p \leq 0,001$; *N. ceranae* jarabe – *N. ceranae* polen polifloral 2 $p \leq 0,001$; *N. ceranae* jarabe – *N. ceranae* polen polifloral 2 $p \leq 0,001$), mientras que las abejas alimentadas con ambos tipos de polen presentaron similar peso (Mann Whitney polen polifloral – polen de *E. grandis* $p = 0,88$; *N. ceranae* polen polifloral – *N. ceranae* polen de *E. grandis* $p = 0,72$) (Fig. 15).

La infección por *N. ceranae* no afectó el peso de las abejas alimentadas con polen (Mann Whitney, polen polifloral – *N. ceranae* polen polifloral $p = 0,3$; polen polifloral – *N. ceranae* polen de *E. grandis* $p = 0,19$), mientras que disminuyó el peso en el caso de abejas alimentadas con jarabe (Mann Whitney $p = 0,002$) (Fig. 15).

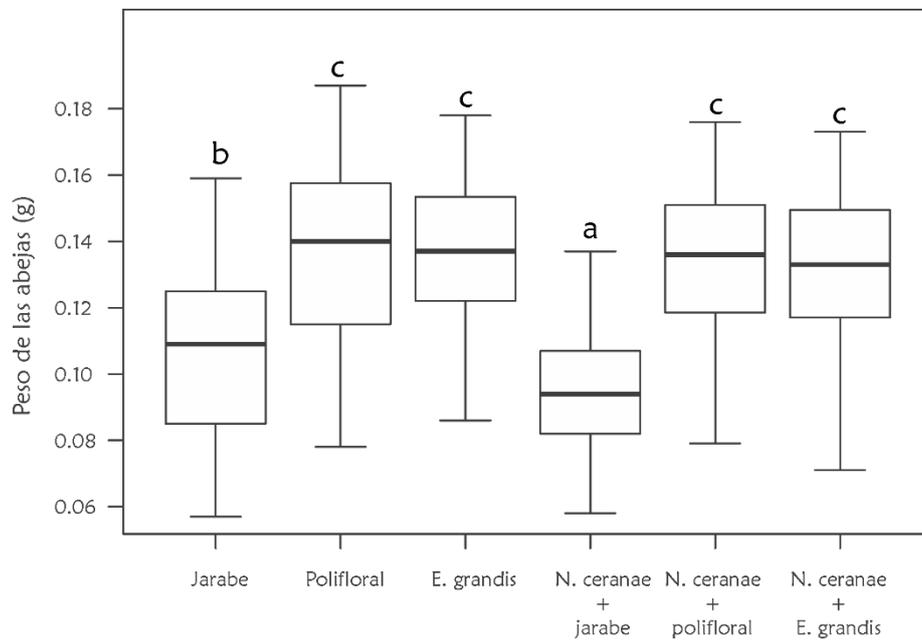


Figura 15. Peso de abejas muertas pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

5.4.3.4. Nivel de expresión de genes vinculados al estado nutricional y al comportamiento

Con el objetivo de analizar el efecto de la dieta y la infección con *N. ceranae* en el estado nutricional y comportamental, se analizó la expresión de los genes *vg*, *mrjp1*, y *mfe* de las abejas sometidas a los distintos tratamientos. Debido a las múltiples comparaciones y con el objetivo de facilitar la lectura y comprensión, se destacan principalmente las comparaciones que resultaron estadísticamente significativas. Asimismo, para facilitar la visualización gráfica, no se incluyó el nivel de expresión de las abejas recién emergidas. Para mayor detalle de los resultados estadísticos de los modelos y de las comparaciones entre grupos a tiempos específicos, se presentan las Tablas 3 y 4 del Apéndice 2, respectivamente.

Los niveles de expresión de *vg* se vieron afectados positivamente por la alimentación con polen, es decir que ambas dietas polínicas aumentaron los niveles de expresión de este gen en relación a las alimentadas con jarabe (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 16; Tabla 3, Apéndice 2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de este gen en abejas alimentadas con polen polifloral 2 y polen de *E. grandis* 2, tanto en abejas sanas como infectadas con *N. ceranae* a los distintos tiempos (Mann Whitney, $p \geq 0,05$) (Tabla 4, Apéndice 2). Los niveles de expresión de esta variable fueron mayores en las abejas infectadas con *N. ceranae* y disminuyeron significativamente en el tiempo en comparación a las no infectadas (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 16; Tabla 3, Apéndice 2).

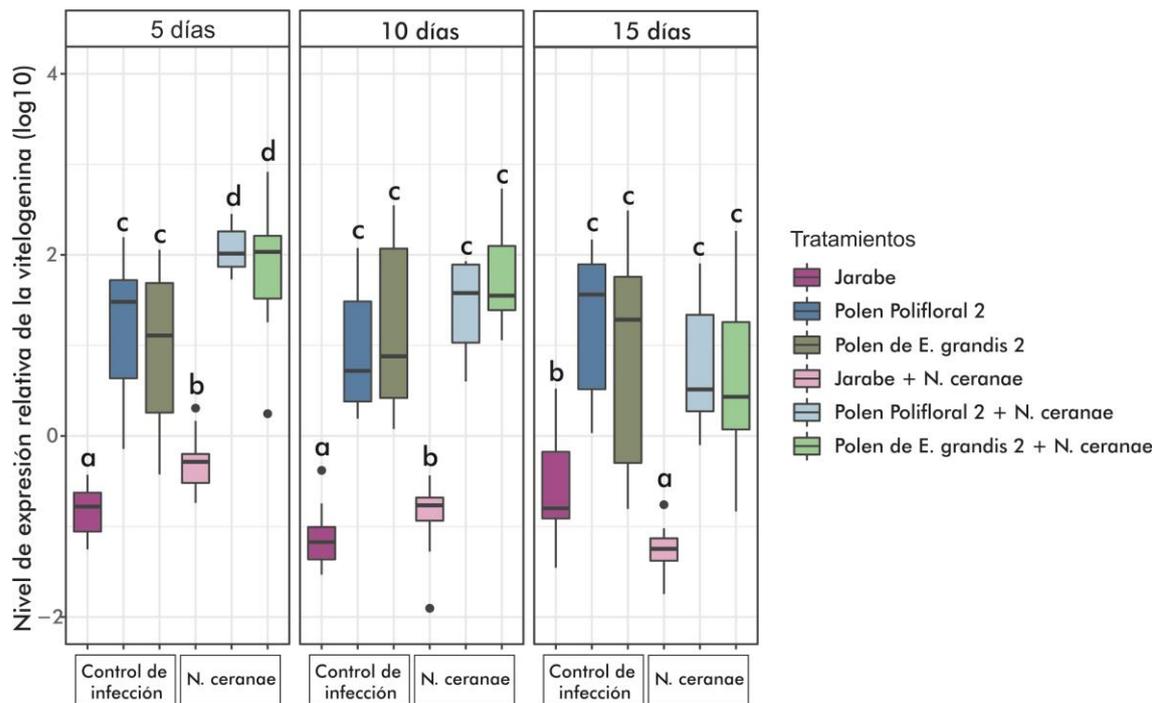


Figura 16. Expresión relativa del gen *vg* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15).

Los niveles de expresión de *mrjp1* se vieron afectados por las mismas variables que afectaron los niveles de la *vg* (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 17; Tabla 3 y Tabla 4, Apéndice 2). Por otro lado, abejas alimentadas con polen e infectadas con *N. ceranae* presentaron menor nivel de infección en comparación a abejas sanas y alimentadas con jarabe (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 17; Tabla 3, Apéndice 2). Abejas infectadas con *N. ceranae* y alimentadas con polen de *E. grandis 2* presentaron menores niveles de expresión de *mrjp1* que las alimentadas con polen polifloral 2 a los 10 días de vida (Mann Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 17; Tabla 4, Apéndice 2, Apéndice 2). La misma tendencia se observó a los 15 días de vida, pero debido a la variación, las diferencias no son estadísticamente significativas (Mann Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 17; Tabla 4, Apéndice 2).

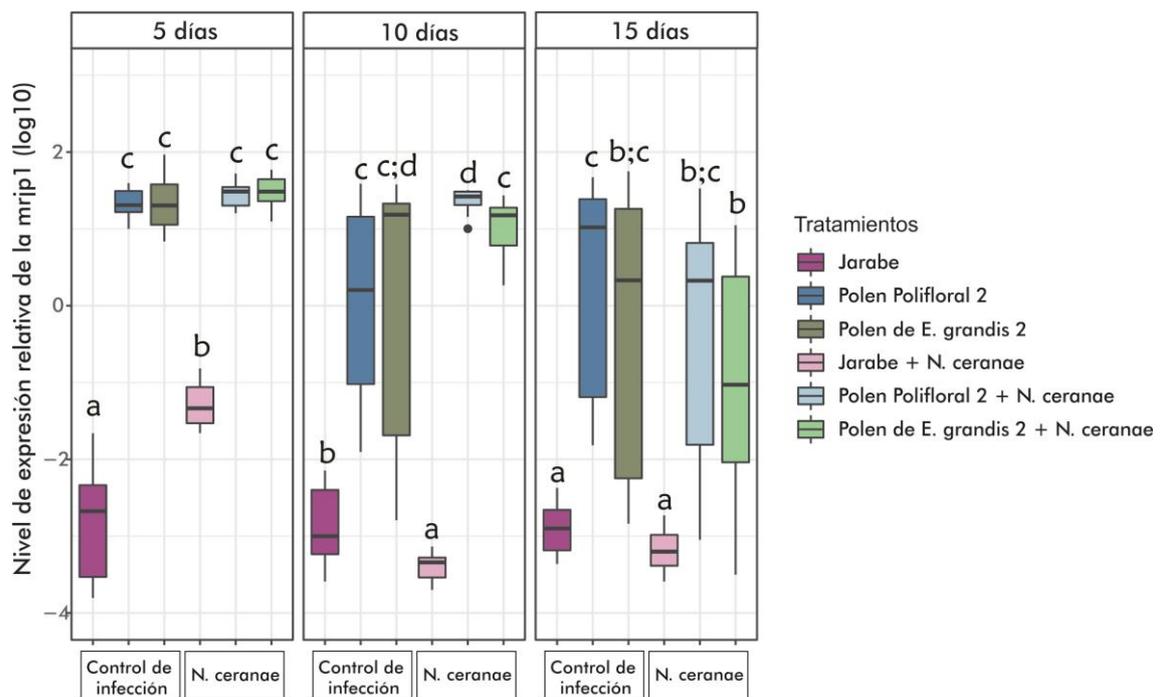


Figura 17. Expresión relativa del gen *mrjp1* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15).

Por otro lado, los niveles de expresión de *mfe* aumentaron en el tiempo en las abejas alimentadas con polen (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 18; Tabla 3, Apéndice 2). La dieta, el tiempo y la infección con *N. ceranae* por sí mismos no afectaron los niveles de expresión de este gen (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 18; Tabla 3, Apéndice 2).

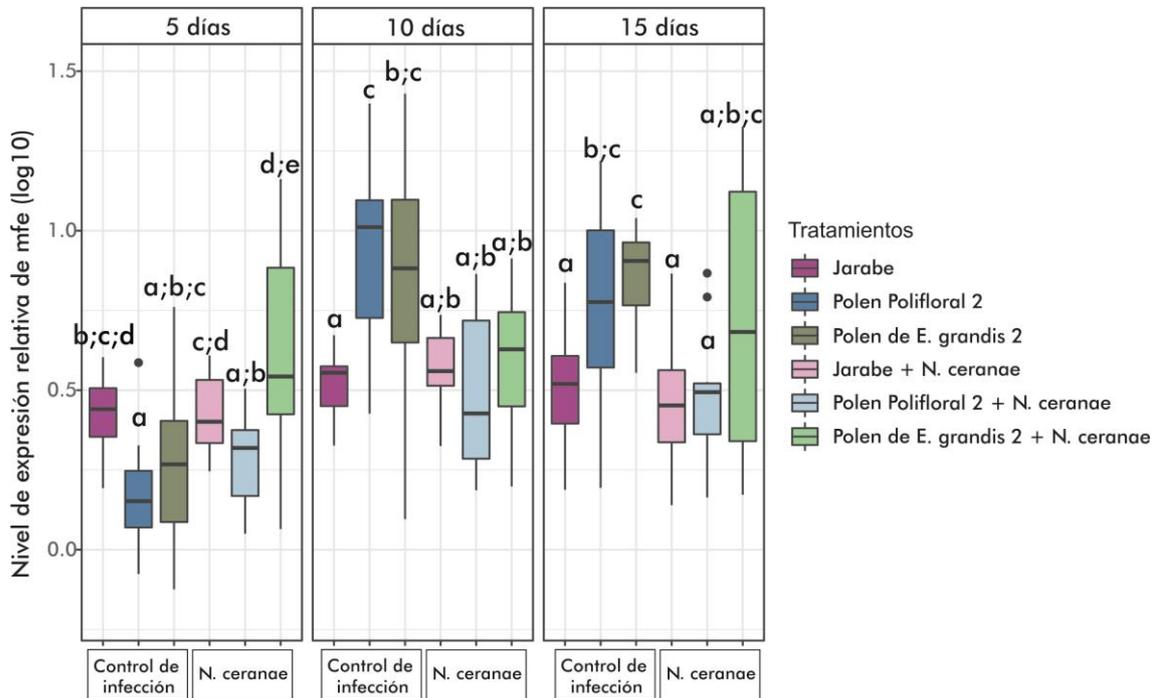


Figura 18. Expresión relativa del gen *mfe* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15).

5.4.3.5. Nivel de expresión de genes vinculados a la respuesta inmune

Se analizó el efecto de la dieta, el tiempo y la infección con *N. ceranae* en los niveles de expresión de genes vinculados a la respuesta inmune humoral (*def*, *dorsal* e *him*) y genes vinculados a la respuesta inmune celular (*act-ppo* y *ppo*).

En cuanto a los niveles de expresión de *def*, si bien existen diferencias a tiempos específicos entre abejas pertenecientes a los distintos tratamientos (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$) (Fig. 19; Tabla 4, Apéndice 2), en términos generales este parámetro no se vio afectado por ninguno de los factores de interés ni por la interacción entre ellos (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 19; Tabla 3, Apéndice 2).

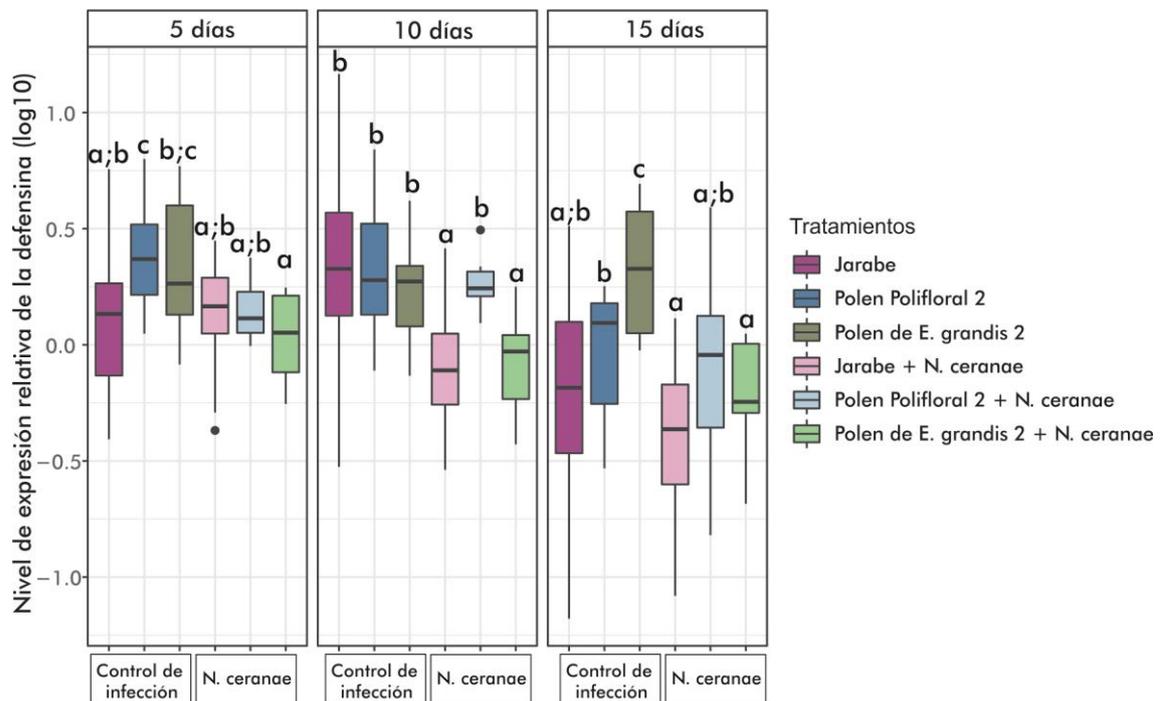


Figura 19. Expresión relativa del gen *def* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15 días).

Los niveles de expresión de *dorsal* fueron menores en las abejas alimentadas por el polen de *E. grandis* 2 en comparación a las alimentadas con jarabe, mientras que las restantes dietas, la infección con *N. ceranae* y el tiempo no afectaron esta variable (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 20; Tabla 3, Apéndice 2).

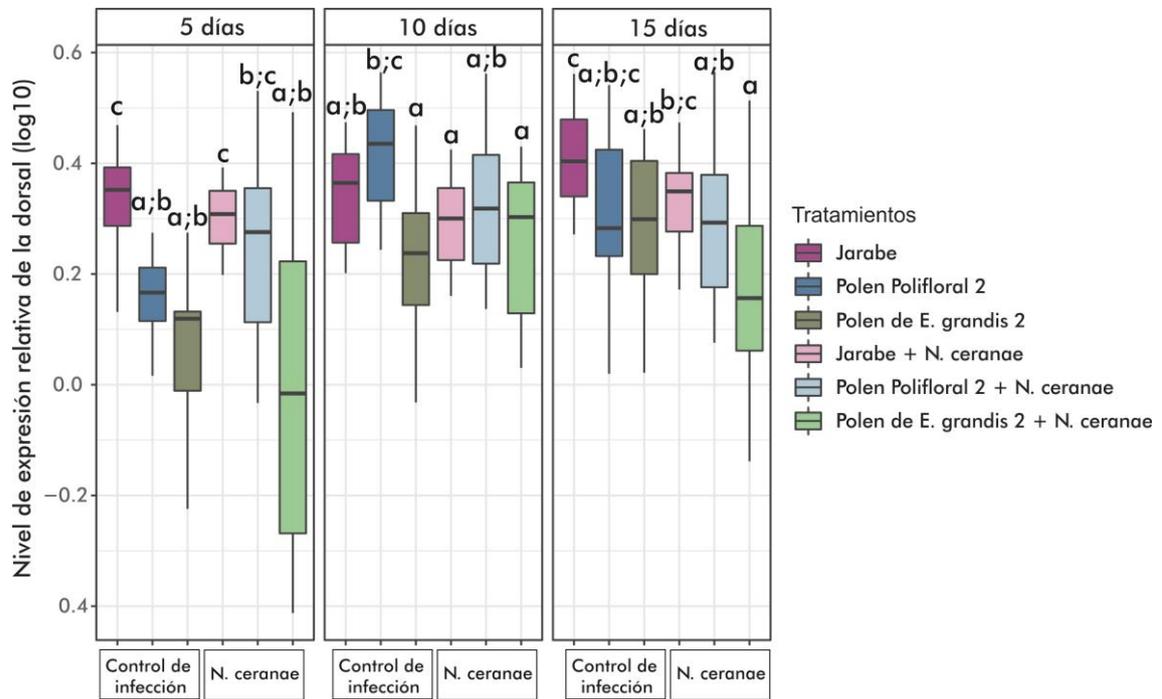


Figura 20. Expresión relativa del gen *dor* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15 días).

De forma similar a *dorsal*, los niveles de expresión de la *him* se vieron afectados de forma negativa por la alimentación con polen de *E. grandis* 2, es decir que las abejas que consumieron este polen presentaron menor nivel de expresión de este gen en comparación a las alimentadas con jarabe (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 21; Tabla 3, Apéndice 2). Además, los niveles de *him* aumentaron en el correr del tiempo en las abejas infectadas con *N. ceranae* (Fig. 21; Tabla 3, Apéndice 2). A tiempos específicos, existe una tendencia a que las abejas alimentadas con jarabe presenten mayor nivel de expresión de este gen en comparación a las abejas alimentadas con polen. Esta diferencia es estadísticamente significativa únicamente en abejas de 5 días de edad (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$) (Fig. 21; Tabla 4, Apéndice 2).

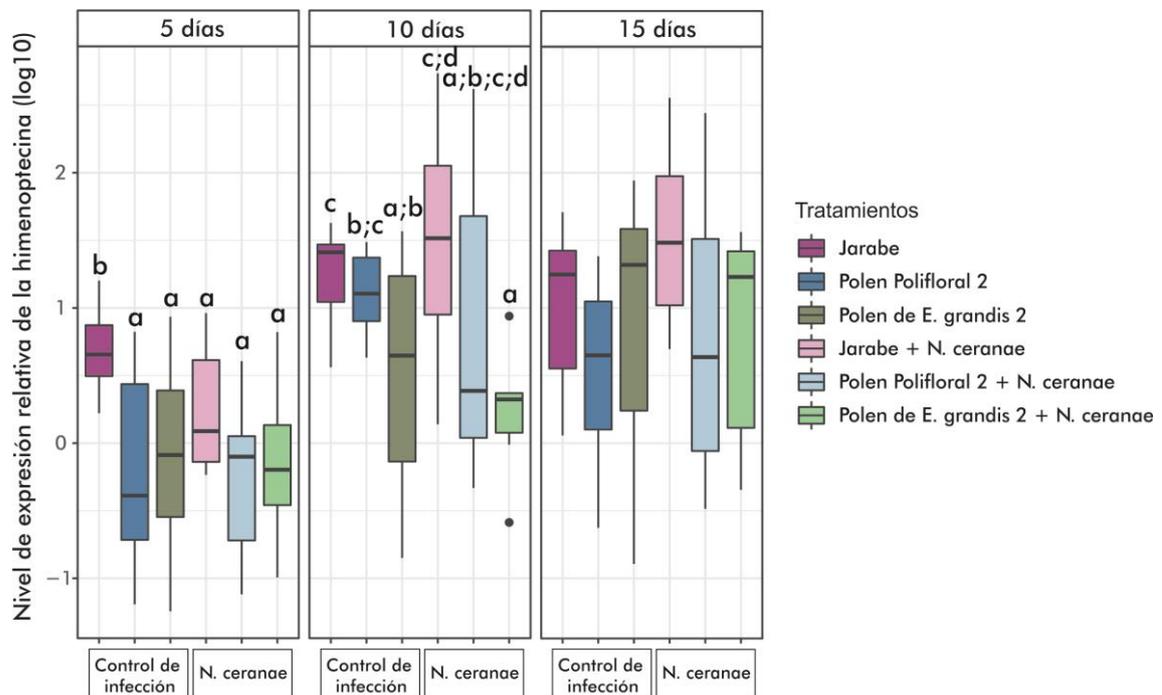


Figura 21. Expresión relativa del gen *him* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15 días).

Los niveles de expresión de *ppo_act* fueron mayores en las abejas infectadas con *N. ceranae* y disminuyeron en el tiempo en comparación a las abejas no infectadas (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 22; Tabla 3, Apéndice 2). Por otro lado, los niveles de este gen aumentaron en el correr del tiempo en las abejas alimentadas con el polen polifloral 2 y con el de *E. grandis* 2 (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 22; Tabla 3, Apéndice 2). A los 15 días de vida, las abejas infectadas presentaron significativamente menor nivel de expresión de *ppo_act* en comparación a las no infectadas. Las abejas alimentadas con polen presentaron mayor expresión de este gen en comparación a las alimentadas con jarabe (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$) (Fig. 22; Tabla 4, Apéndice 2).

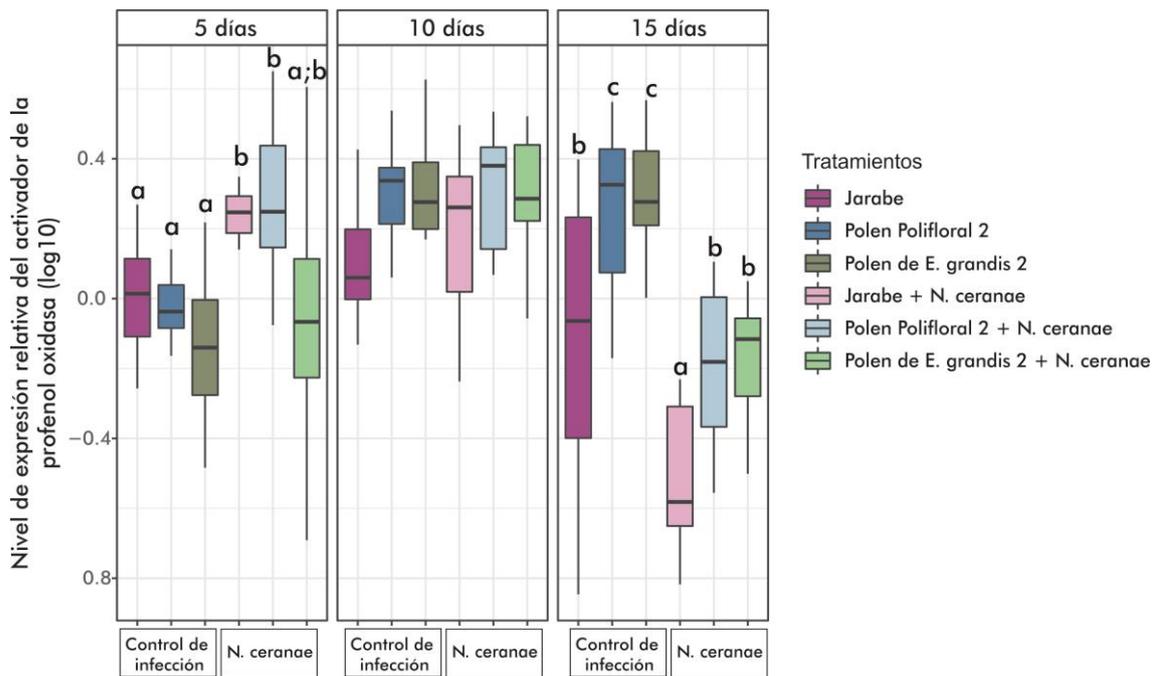


Figura 22. Expresión relativa del gen *ppo_act* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15 días).

Los niveles de expresión de *ppo* se vieron afectados positivamente por la alimentación con el polen polifloral 2, por lo que abejas alimentadas con esta dieta presentaron mayores niveles de expresión de este gen en comparación a las alimentadas con jarabe (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 23; Tabla 3, Apéndice 2). Este efecto se observó también en la interacción entre la infección con *N. ceranae* y la alimentación con polen (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 23; Tabla 3, Apéndice 2). Por último, los niveles de la *ppo* disminuyeron en el tiempo en las abejas alimentadas con el polen polifloral 2, pero no así en las abejas alimentadas con las restantes dietas (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 23; Tabla 3, Apéndice 2). Las abejas de 5 días de vida alimentadas con polen presentaron mayor nivel de expresión de este gen que las alimentadas con jarabe, pero esta diferencia no se observó en los subsiguientes muestreos (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$) (Fig. 23; Tabla 4, Apéndice 2).

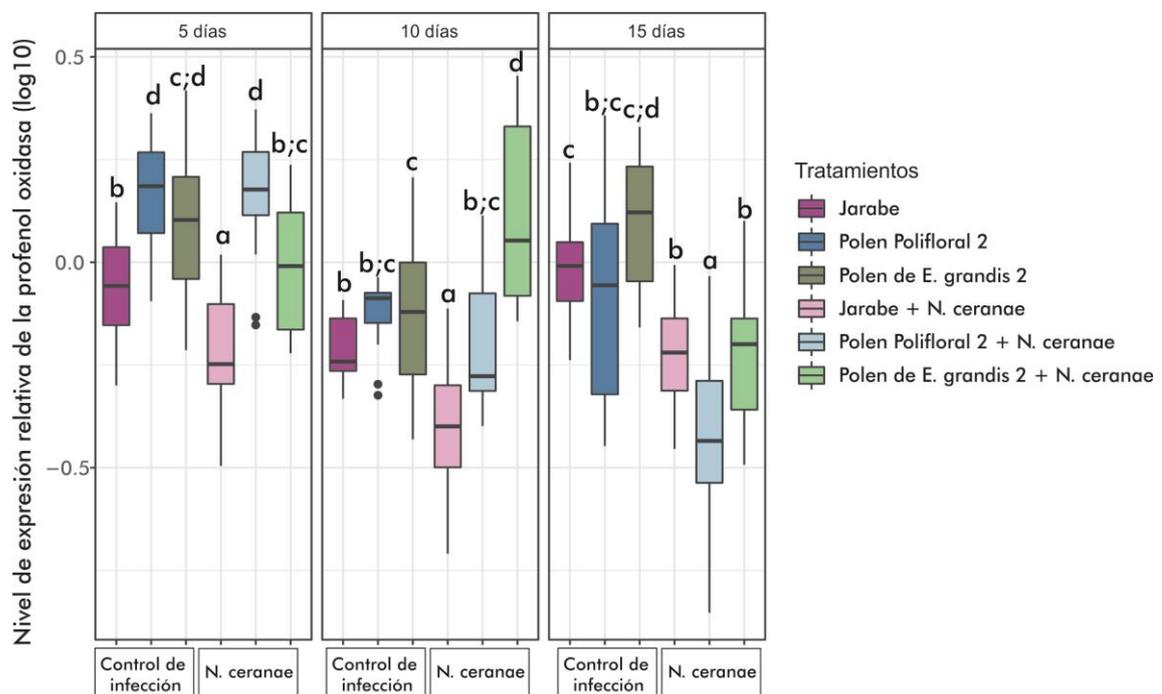


Figura 23. Expresión relativa del gen *ppo* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15).

5.4.3.6. Nivel de infección con DWV

Los niveles de infección del DWV fueron significativamente menores en las abejas infectadas con *N. ceranae* en comparación a las no infectadas (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 24; Tabla 3, Apéndice 2). Por otro lado, en abejas alimentadas con el polen de *E. grandis* 2 e infectadas con *N. ceranae*, los niveles del DWV fueron mayores en comparación a las abejas alimentadas con jarabe e infectadas con este microsporidio (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 24; Tabla 3, Apéndice 2).

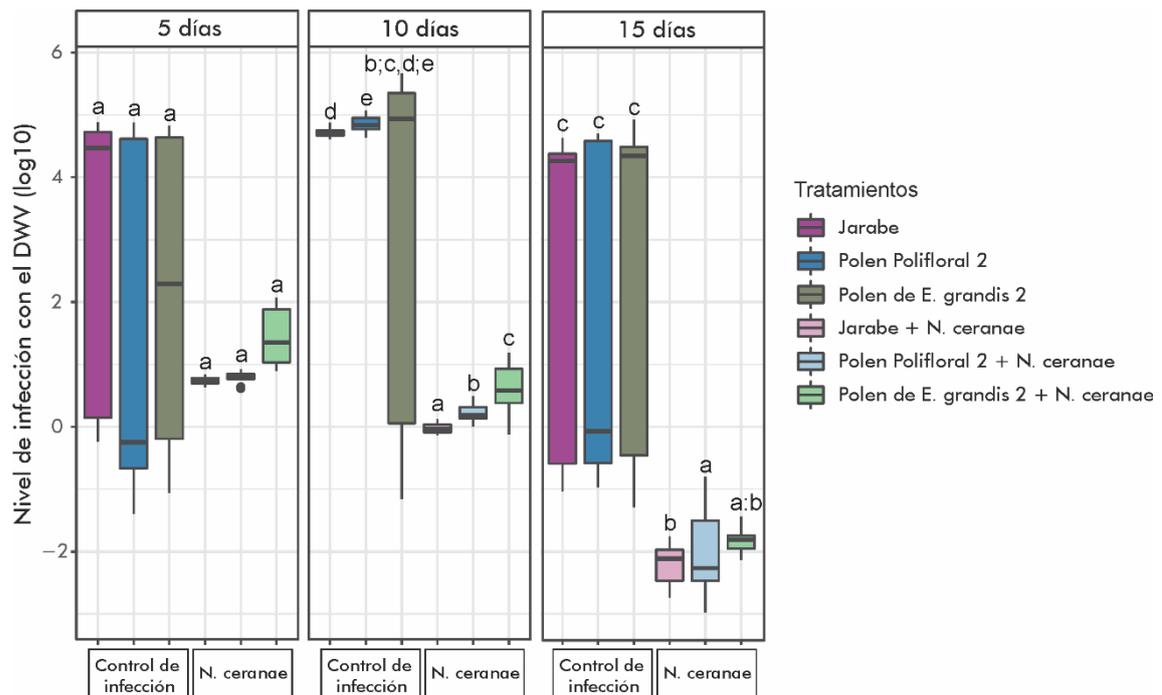


Figura 24. Nivel de infección con el Virus de alas deformes (DWV) de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15).

5.4.3.7. Nivel de infección con *Nosema ceranae*

Los niveles de infección con *N. ceranae* aumentaron significativamente en el tiempo en abejas alimentadas con polen en comparación a los niveles de las abejas alimentadas con jarabe, siendo dicho aumento significativo en las abejas alimentadas con polen polifloral 2 y marginalmente significativo en las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* 2 (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 25; Tabla 3, Apéndice 2). Dichos niveles se dispararon a los 5 días en las abejas alimentadas únicamente con jarabe siendo superiores al de las abejas alimentadas con polen (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$) (Fig. 25; Tabla 3, Apéndice 2). A los 10 días de vida, las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* 2 presentaron mayores niveles de infección con este microsporidio en comparación a las abejas de los restantes muestreos (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$) (Fig. 25; Tabla 3, Apéndice 2), mientras que a los 15 días de edad las abejas alimentadas con polen (independientemente de su origen botánico) presentaron mayores niveles de infección con *N. ceranae* que las alimentadas con jarabe (Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$) (Fig. 25; Tabla 3, Apéndice 2).

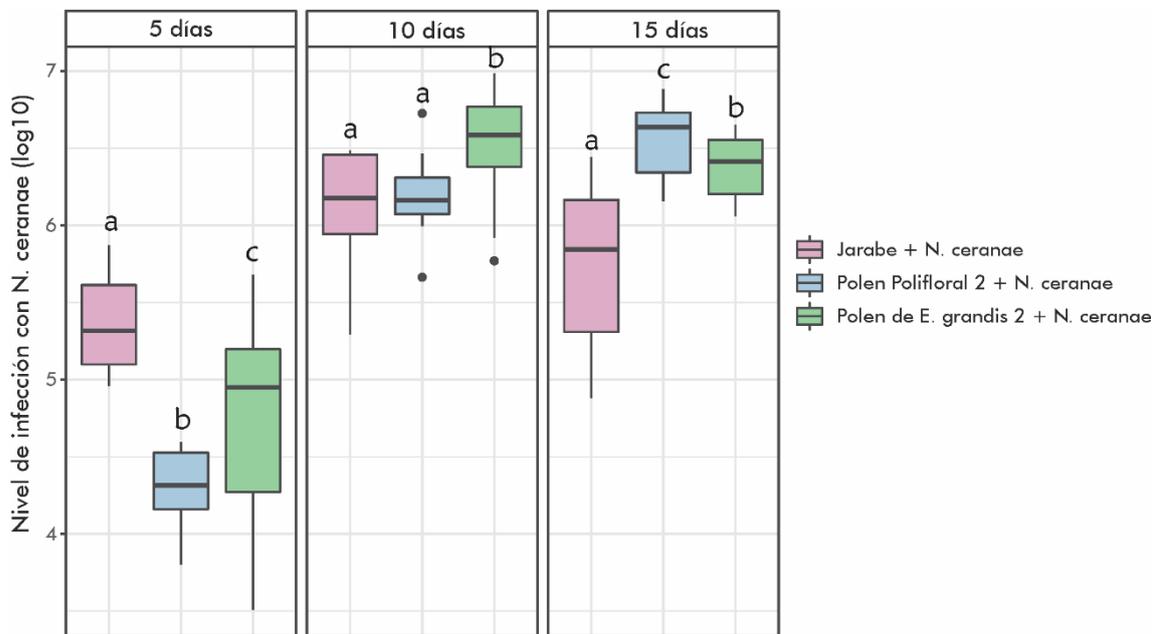


Figura 25. Nivel de infección *Nosema ceranae* de las abejas muestreadas a los 5, 10 y 15 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos a cada tiempo (5, 10 o 15).

En resumen, la alimentación con polen y la infección con *N. ceranae* promovió la expresión de los genes vinculados a la nutrición y al comportamiento (*vg* y *mrjpl*), pero la respuesta asociada a la infección con este patógeno disminuyó en el tiempo. En cuanto a los genes vinculados a la respuesta inmune, la alimentación con polen de *E. grandis* deprimió los mecanismos estudiados asociados a la respuesta inmune humoral (*dorsal* e *him*), mientras que la alimentación con polen promovió la respuesta inmune celular (*ppo*). Además, la expresión de *him* aumentó en las abejas infectadas con *N. ceranae*. Por otro lado, los niveles de infección con el DWV fueron menores en las abejas infectadas con *N. ceranae*. Por último, los niveles de infección con este microsporidio aumentaron en el tiempo en las abejas alimentadas con polen, alcanzando valores superiores a los de las abejas alimentadas con jarabe.

5.5- Discusión

Durante los últimos años se han reportado episodios masivos de pérdidas de colonias de abejas *A. mellifera* y entre las principales causas asociadas se encuentra el estrés nutricional de las abejas y la infección con múltiples plagas y patógenos (Naug, 2009; Carreck & Neumann, 2010; Ellis *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010a). Sin embargo, se desconocen los mecanismos fisiológicos por los cuales el estrés nutricional generaría tales consecuencias. Existen distintas líneas de evidencia que sugieren una conexión entre el estrés nutricional de las abejas, su supervivencia, su respuesta inmune, su susceptibilidad frente a la infección con patógenos y la división de tareas (Toth, 2005; Toth & Robinson, 2005; Alaux *et al.*, 2010; Amdam *et al.*, 2010; Ament *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013). Dicha conexión podría darse tanto de forma directa mediante un efecto del estrés nutricional sobre los distintos mecanismos fisiológicos de las abejas, como de forma indirecta a través de funciones asociadas a la comunidad bacteriana intestinal de las abejas. En este capítulo se planteó como objetivo, profundizar en la dilucidación de los mecanismos mediante los cuales el estrés nutricional y la infección con *N. ceranae* afectan la fisiología de las abejas y su susceptibilidad frente a la infección con el DWV.

Por un lado, se evaluó el efecto de distintas dietas en diferentes parámetros fisiológicos de las abejas. Se escogió una dieta basada únicamente en carbohidratos (jarabe de sacarosa) como control de déficit extremo de proteínas, dos dietas de pólenes monoflorales con distintas características nutricionales para las abejas y dos dietas de polen polifloral como ejemplos de dietas potencialmente ideales. El hecho que las abejas alimentadas únicamente con jarabe hayan sobrevivido significativamente menos que las alimentadas con polen (tanto sanas como infectadas con *N. ceranae*), demuestra la importancia de la alimentación con polen sobre las abejas, ya sea debido al suministro de aminoácidos esenciales y/o lípidos y micronutrientes (De Groot, 1953; Manning, 2001a; Di Pasquale *et al.*, 2013). Los efectos positivos de la alimentación con polen también se vieron reflejados en el peso de las abejas, parámetro utilizado como indicativo del estado nutricional, y en los niveles de expresión de la *vg* y *mrip1*, marcadores moleculares asociados al estado nutricional y comportamental de las abejas. Por otro lado, teniendo cuenta que se plantea que colmenas ubicadas en plantaciones de *E. grandis* sufren estrés nutricional y las abejas se debilitan debido posiblemente a la baja calidad nutricional del polen de estos árboles (Somerville, 2001; Somerville &

Nicol, 2006; Invernizzi *et al.*, 2011a, 2020; Mendoza *et al.*, 2012), se esperaba observar un efecto negativo de la alimentación con este polen en la supervivencia y fisiología de las abejas en comparación a abejas alimentadas con polen de *B. trimera* o polen polifloral. Sin embargo, abejas alimentadas con estos tipos de pólenes mostraron similar supervivencia. Por un lado, la calidad nutricional de los dos pólenes monoflorales utilizados fue diferente: el polen de *E. grandis* mostró menor porcentaje de proteínas (aunque la diferencia fue menor a dos puntos porcentuales) y bajo contenido de lípidos, mientras que si bien no se analizó el contenido de lípidos del polen de *Baccharis* spp., se ha reportado que el polen proveniente de especies de este género posee un alto contenido de lípidos (Somerville, 2001; Somerville & Nicol, 2006). Además, el valor nutricional de las distintas especies de polen puede diferir según su digestibilidad, parámetro no analizado en esta tesis. Por lo tanto, los resultados observados sugieren que posiblemente sean necesarias diferencias nutricionales mayores entre las dietas para observar un efecto en la supervivencia de las abejas (al menos en condiciones de laboratorio, donde los factores ambientales son controlados). Es importante además resaltar, que esta ausencia de efecto en la supervivencia de las abejas se dio a pesar de que las abejas alimentadas con polen de *B. trimera* consumieron más polen que las alimentadas con el de *E. grandis*. Este mayor consumo pudo deberse a su alto contenido de lípidos, los cuales poseen efecto fagoestimulante (Singh *et al.*, 1999). Por otro lado, se comprobó que el polen monofloral de *E. grandis* no es necesariamente más pobre que el polen polifloral según los marcadores nutricionales del polen analizados (a excepción de los lípidos), coincidiendo con los resultados reportados por Di Pasquale y colaboradores (2013).

La diferencia en la supervivencia de las abejas alimentadas con jarabe y polen se vio respaldada por los resultados de expresión de los genes que codifican para la Vg, Mrjp1 y Mfe, ya que, considerando los patrones de expresión de estos genes a lo largo de la vida de la abeja, las abejas más envejecidas (y pecoreadoras en el campo) presentan menores niveles de Vg y Mrjp1 y mayores niveles de Mfe (Amdam & Omholt, 2002; Guidugli *et al.*, 2005). Tanto la Vg como las distintas MRJPs están fuertemente relacionadas con la nutrición de las abejas ya que la Vg es el principal transportador de proteínas en la hemolinfa y la Mrjp1 es la principal proteína de la jalea real (Schmitzová *et al.*, 1998; Buttstedt *et al.*, 2013). Además, existe una relación causal entre el consumo de proteínas y los niveles de Vg y hormona juvenil, ya que se ha reportado que el

consumo de polen es necesario para inducir la expresión de Vg (Cremonez *et al.*, 1998; Corona *et al.*, 2007). La reducción experimental de la expresión de este gen determina un aumento en los títulos de la hormona juvenil y a nivel de campo una inducción de pecoreo precoz (Guidugli *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008). De esta forma, el estado nutricional de las abejas a lo largo de su vida genera alteraciones en su fisiología y estas alteraciones se observan en el comportamiento a nivel de campo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el primer ensayo, a los 7 días de vida las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* o *B. trimera* están mejor nutridas que las alimentadas con jarabe, presentando un patrón de expresión de los genes característico de abeja nodriza. De forma similar, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el segundo ensayo de este capítulo, las abejas sanas alimentadas con polen de *E. grandis* o polifloral tuvieron un patrón de abeja nodriza hasta los 15 días de vida, mientras que las alimentadas con jarabe presentaron un patrón de abejapecoreadora a los 5 días de vida. Al comparar los dos tipos de polen monoflorales empleados en el ensayo 1, las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* a los 14 días mostraron un patrón similar a las alimentadas con jarabe, sugiriendo un patrón de expresión típico de abeja pecoreadora y consecuentemente una transición a pecoreadora previa a las abejas alimentadas con polen de *B. trimera*. Por lo tanto, el patrón de expresión de estos genes y la asociación entre ellos (principalmente en las abejas alimentadas con polen) sugiere que a pesar de que en condiciones de laboratorio las abejas no realizan actividades de nodrizas y pecoreadoras, los mecanismos fisiológicos asociados a estos comportamientos pueden ser monitoreados. En conjunto estos resultados extrapolados a nivel de campo sugieren que, en un escenario con ausencia de polen y únicamente acceso a carbohidratos ya sea por reservas de miel o alimentación artificial, las abejas podrían comenzar a pecorear a una edad temprana, acelerando de esta forma su transición de tareas y colapsando más rápidamente. Resultados similares se observaron con una alimentación basada en polen de *E. grandis* a partir de los 14 días de vida. Por último, el aumento en el nivel de expresión de *vg* en abejas alimentadas con jarabe entre los 7 y 14 días en el primer ensayo, y entre los 10 y 15 días en el segundo fue llamativo ya que se espera una dinámica inversa. Dicha variación podría deberse a que, frente a tal estrés nutricional, las abejas movilizan hacia los 10-14 días de vida las pocas reservas nutricionales que posee para mejorar su supervivencia.

Por otro lado, se comprobó el efecto negativo de la infección con *N. ceranae* en la supervivencia de las abejas, independientemente de la dieta recibida. El hecho de que abejas infectadas y alimentadas con jarabe presentaran menor peso que las sanas alimentadas con la misma dieta, pero que abejas alimentadas con polen sanas e infectadas presentaran similar peso, sugiere que las consecuencias del estrés energético asociado a la infección con *N. ceranae* es mayor cuando las abejas tienen déficit nutricional extremo. Por otro lado, resulta llamativo que los niveles de expresión de *vg* y *mrjp1* fueran mayores en abejas infectadas en comparación con abejas sanas, considerando que *N. ceranae* afecta las funciones digestivas de las abejas y la absorción de nutrientes (Mayack & Naug, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011). Este resultado se dio principalmente en la primera etapa de vida, y estaría indicando que la expresión de estos marcadores moleculares no solo responde al estado nutricional, sino que también a la infección con este microsporidio. La activación de la expresión de *vg* podría reflejar una respuesta de remoción de radicales tóxicos generados a partir del daño tisular asociado a la infección con *N. ceranae* (Amdam *et al.*, 2004; Higes *et al.*, 2007), mientras que el aumento de *mrjp1* podría deberse a cambios en el metabolismo de las abejas asociados al costo de la infección (Doublet *et al.*, 2017). Resulta importante resaltar que el hecho de que la expresión de ambos genes disminuya con el tiempo en abejas infectadas con *N. ceranae* pero no así en abejas sanas, sugiere que los mecanismos fisiológicos asociados a esta mayor expresión génica en la primera etapa de vida se agota rápidamente. Esto es importante a tener en cuenta al contrastar los efectos fisiológicos de la infección analizados en distintos estudios (Antúnez *et al.*, 2009, 2013; Alaux *et al.*, 2011b; Chaimanee *et al.*, 2012), ya que comparaciones a tiempos puntuales pueden no reflejar las consecuencias reales de la infección en las abejas. Además, posiblemente esta disminución en la expresión de estos genes en abejas infectadas en el tiempo refleje el aceleramiento en la transición de tareas y envejecimiento precoz reportado para abejas infectadas con este microsporidio (Higes *et al.*, 2007; Di Pasquale *et al.*, 2013).

Desde otra perspectiva, se ha propuesto que el sistema inmune de las abejas varía a lo largo de su vida, decayendo cuando éstas cambian de realizar actividades de abeja nodrizas a actividades de abejas pecoreadoras (Amdam *et al.*, 2004). Esta hipótesis se fundamenta en que el mantenimiento del sistema inmune es energéticamente costoso (Moret & Schmid-Hempel, 2000) y las abejas pecoreadoras tienen mayores

probabilidades de morir en el campo. De esta manera, la colonia ahorraría energía, concentrando los recursos nutricionales dentro de la colmena en las abejas nodrizas (Amdam *et al.*, 2004). Por lo tanto, así como los marcadores nutricionales y comportamentales (como *vg*, *mrip1* y *mfe*) varían a lo largo de la vida de las abejas, los marcadores inmunes deberían variar. En este estudio, se encontró una relación inversa entre los marcadores de nutrición y comportamiento, y los inmunes en abejas alimentadas con polen, sugiriendo que existe cierta coordinación en los patrones de expresión de estos marcadores a lo largo de la vida de las abejas. Dicha coordinación coincide con la reportada por Corona y colaboradores (submitido) considerando los marcadores moleculares analizados en esta tesis, pero es opuesta a la reportada por Amdam y colaboradores (2004) considerando a la cantidad de hemocitos como marcadores inmunes. El hecho que las abejas con un patrón de expresión característico de abeja pecoreadora presenten mayor expresión de genes inmunes sugiere, además, que en caso que exista un mecanismo de ahorro de energía involucrando a la respuesta inmune, distintas vías de respuesta inmune se activan o deprimen frente al cambio de comportamiento. De esta forma, las abejas no quedarían totalmente desprovistas de defensas en etapa de pecoreadoras.

Por otro lado, si bien se encuentra ampliamente documentada la asociación entre nutrición y respuesta inmune de las abejas, las características de dicha asociación no están claras. Di Pasquale y colaboradores (2013) realizaron un estudio muy completo en el cual compararon distintas dietas de polen considerando su origen botánico y calidad nutricional, sobre distintos parámetros fisiológicos de las abejas. Estos autores reportaron que una dieta de polen polifloral puede ser equivalente a una dieta de polen monofloral, aunque en ciertas condiciones podría mejorar la tolerancia frente a la infección con patógenos. En particular, encontraron que no hay una asociación directa entre el porcentaje de proteína del polen y la supervivencia de las abejas, los niveles de *vg* y la actividad fenol oxidasa, entre otros parámetros analizados (Di Pasquale *et al.*, 2013). De hecho, encontraron que las abejas alimentadas solamente con jarabe presentan una mayor actividad fenol oxidasa que las alimentadas con polen con alto contenido de proteínas y lípidos, sugiriendo que al menos este mecanismo inmunológico no se vería afectado directamente por la nutrición de las abejas (Di Pasquale *et al.*, 2013). Con un abordaje metodológico parecido, Alaux y colaboradores (2010) obtuvieron resultados similares para la actividad de esta enzima. Sin embargo,

encontraron también que la alimentación con polen (monofloral con distintas concentraciones de proteínas o polifloral) aumenta la masa de los cuerpos grasos (sitio de producción de compuestos antimicrobianos) y disminuye la concentración de hemocitos en comparación a las alimentadas solamente con jarabe. Además, estos autores reportaron que la actividad de la glucosa oxidasa aumenta en abejas alimentadas con polen en comparación a las alimentadas con jarabe, siendo mayor en las que consumieron polen polifloral que monofloral (Alaux *et al.*, 2010). Por otro lado, Castelli y colaboradores (2015) reportaron que abejas alimentadas con polen polifloral presentan mayor expresión de los genes que codifican para la glucosa oxidasa, himenoptecina y lizosima, pero no así para la glucosa deshidrogenas y defensina en comparación a las alimentadas con polen de *E. grandis*. Por lo tanto, resulta evidente que los distintos mecanismos inmunes responden diferente frente a las dietas, y la composición nutritiva del polen repercute diferencialmente en estos parámetros. En los ensayos de este capítulo, el único gen cuya expresión aumentó por la alimentación con polen fue el que codifica para la enzima *ppo* (principalmente en el segundo ensayo). Estudios previos reportaron resultados similares, pero sin respaldo estadístico (Alaux *et al.*, 2010, 2011a). Posiblemente el número de abejas analizadas, el estudio a varios tiempos y el análisis de expresión del gen que codifica para la enzima clave en esta respuesta en lugar de la medición de su actividad, haya permitido esta mayor sensibilidad. Resulta llamativo que la alimentación con polen no haya tenido un efecto positivo en la expresión de los restantes genes inmunes analizados, ya que se ha reportado que abejas mejor nutridas son capaces de montar una respuesta inmune más activa que las alimentadas con jarabe, considerando marcadores de inmunidad humoral y social (Alaux *et al.*, 2010). La falta de coincidencia entre los resultados obtenidos por Alaux y colaboradores y los obtenidos en este estudio pueden deberse por un lado a que se midieron distintos parámetros como indicativos de la respuesta inmune humoral. En ese sentido, la masa de los cuerpos grasos analizada en el estudio previamente mencionado podría ser un parámetro más general ya que se trata del sitio de producción de los péptidos antimicrobianos, mientras que la expresión de los genes inmunes estaría reflejando un panorama más específico. Una segunda posibilidad, sería que los mecanismos inmunológicos se activen o depriman frente al consumo de ciertos compuestos presentes en el polen. Este último aspecto sería también coherente con la menor expresión de *dorsal* e *him* en abejas alimentadas con polen de *E. grandis* en comparación a las alimentadas con jarabe (resultados del segundo ensayo) y en

comparación a las alimentadas con polen polifloral (Castelli, 2017). Posiblemente, a nivel de campo este último aspecto determine una mayor susceptibilidad frente a la infección con patógenos en colmenas ubicadas en plantaciones de *E. grandis*.

Por otro lado, la *him* y *ppo* fueron los únicos dos genes vinculados a la respuesta inmune cuya expresión aumentó en abejas infectadas con *N. ceranae*, siendo este aumento dependiente del tiempo al igual que los niveles de infección con este patógeno. Esto sugiere que posiblemente esta respuesta inmune sea una consecuencia del aumento de los niveles de infección con *N. ceranae* y confirma que la *him* es un mecanismo cuya expresión se activa en las abejas frente a la infección con patógenos (Doublet *et al.*, 2017). A pesar de que la expresión de estos genes se activó frente a la infección, el aumento en su expresión no contuvo la reproducción del microsporidio ya que las abejas alimentadas con polen presentaron mayor expresión de *ppo* pero también mayor nivel de infección con *N. ceranae* en comparación a las alimentadas con jarabe. Sin embargo, teniendo en cuenta que se trata de un modelo experimental, es posible que, bajo otras condiciones experimentales, la activación de estos mecanismos inmunológicos sea efectiva suprimiendo la replicación de *N. ceranae*. Resultó inesperado el hecho que la expresión del *act_ppo* y la *ppo* no mostraran un patrón de expresión similar, a pesar de estar conectados en la misma vía de señalización. Esto confirma que la regulación de las vías de señalización es compleja (Evans *et al.*, 2006; Doublet *et al.*, 2017) y por lo tanto en esta discusión se consideraron solo los niveles de la *ppo* debido a que su expresión se da más tardíamente y por lo tanto refleja en mayor medida el mecanismo inmune efector.

La dinámica de infección con *N. ceranae* dependió de la dieta, mostrando un mayor nivel en las abejas alimentadas con polen. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores (Porrini *et al.*, 2011; Basualdo *et al.*, 2014a; Jack *et al.*, 2016), y sugieren que si bien una mejor nutrición promueve la replicación de *Nosema* spp., las consecuencias negativas de dicha infección son controladas por abejas bien nutridas ya que igualmente logran una mejor supervivencia. A su vez, el hecho que abejas alimentadas con ambos tipos de pólenes presenten similares niveles de infección contrasta con resultados obtenidos a nivel de campo de colmenas ubicadas en plantaciones de *E. grandis* (Invernizzi *et al.*, 2011a). Las discrepancias pueden deberse a que en este caso ambos pólenes (monofloral de *E. grandis* y polifloral 2) fueron

nutricionalmente similares o a que el estrés al que se enfrentan las colmenas en dichas plantaciones determine que las abejas no logren detener la infección. Por último, el hecho que los niveles del DWV disminuyeran por la infección con *N. ceranae* confirma la interacción entre ambos patógenos (Costa *et al.*, 2011; Doublet *et al.*, 2015). Estos resultados junto con el hecho que ambos patógenos son intracelulares obligados y dependen de la disponibilidad de recursos celulares para reproducirse, sugieren que *N. ceranae* es más efectivo en la obtención de dichos recursos confirmando estudios previos (Doublet *et al.*, 2015). Además, el hecho que las abejas infectadas con *N. ceranae* y alimentadas con polen de *E. grandis* fueran las que presentaron mayores niveles de infección con el DWV permite proponer que la alta tasa de reproducción de este virus podría estar vinculada a la inmunodepresión de las abejas alimentadas con este polen (Doublet *et al.*, 2017).

Resulta sumamente interesante que los niveles de *vg* disminuyeron en abejas alimentadas con polen de *E. grandis* hacia los 14 días de vida en las abejas del ensayo 1, mientras que los niveles de expresión de este gen se mantuvieron constantes en las abejas del ensayo 2 alimentadas con el mismo tipo de polen. De forma similar, los resultados de la expresión de algunos genes inmunes no coincidieron: en el primer ensayo la expresión de la *him* no varió en abejas alimentadas con las distintas dietas, mientras que, en el segundo ensayo, las abejas alimentadas con polen de *E. grandis* presentaron menor expresión de este gen en comparación a las alimentadas con jarabe. Las diferencias observadas pueden deberse a que se trataba de abejas colectadas en otoño para el caso del ensayo 1 y de primavera en el ensayo 2. La dinámica colonial cambia sensiblemente en ambas épocas del año: en primavera la colmena está en pleno desarrollo, la reina tiene una ovoposición muy activa y las obreras sufren una marcada división de tareas, mientras que en otoño la colmena se prepara para la época menos benévola del año, la postura de la reina disminuye y la división de tareas es casi inexistente (Seeley, 1995). A nivel individual la fisiología de las abejas se ve modificada en ambas épocas del año, con una depresión en la expresión de *vg*, *mfe* y genes vinculados al sistema inmune en abejas de invierno en comparación a abejas de verano (Steinmann *et al.*, 2015) y una mayor probabilidad de sobrevivir el invierno en colmenas cuyas abejas presentan altos niveles de *Vg* (Dainat *et al.*, 2012b). Estos resultados sugieren que el otoño constituye un cuello de botella en el cual la fisiología de la colonia sufre adaptaciones vinculadas a su nutrición de forma de sobrevivir el

invierno (Amdam & Omholt, 2002). Si bien las abejas utilizadas en los ensayos fueron tomadas apenas emergieron y se mantuvieron en condiciones controladas lejos de las variaciones ambientales, las mismas estuvieron dentro de la colonia recibiendo la alimentación característica de las respectivas épocas del año. Teniendo en cuenta los mecanismos de regulación nutricional de la colonia (Brodschneider & Crailsheim, 2010), y de marcadores claves vinculados a la nutrición y división de tareas (Bitondi & Simões, 1996; Toth, 2005; Toth & Robinson, 2005; Ament *et al.*, 2010) y la importancia de ambos factores para asegurar la homeostasis colonial, es esperable que los mismos impacten en la fisiología de las abejas adultas. Por lo tanto, la etapa del año en la que se realizan los ensayos en condiciones controladas debería ser tomada en cuenta a la hora de comparar resultados obtenidos en ensayos independientes.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el estrés nutricional extremo por sí mismo y en interacción con la infección con *N. ceranae* disminuye la supervivencia de las abejas. Asimismo, estos factores afectan la expresión de genes vinculados a su estado nutricional y comportamental e inmunológico. La alimentación con polen promovió la expresión de los genes *vg* y *mrjpl*, mientras que principalmente en abejas de primavera, esta alimentación aumentó la expresión de *ppo*. Por otro lado, se comprobó que el polen de *E. grandis* puede ser equivalente al polen polifloral según distintos parámetros nutricionales y sus efectos en la supervivencia de las abejas, pero inhibe la expresión de genes asociados a su sistema inmune. Abejas alimentadas con polen presentaron mayores niveles de infección con *N. ceranae* a pesar de sobrevivir más que las alimentadas con jarabe, y dicha infección promovió la expresión de *him* y *ppo*. Por último, se comprobó que existe una interacción negativa entre *N. ceranae* y DWV, siendo *N. ceranae* más eficiente en la utilización de los recursos celulares.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la hipótesis planteada y las predicciones asociadas, es posible aceptar de forma parcial la hipótesis, considerando el tipo de dieta (jarabe de sacarosa o dieta monofloral), el gen analizado y la infección con *N. ceranae*.

6. CAPÍTULO 2- Efecto de la microbiota intestinal y la interacción con abejas nodrizas en la alimentación con polen

6.1. Introducción

El polen suministra las proteínas, lípidos, vitaminas y minerales necesarios para la formación y mantenimiento de los tejidos, para cumplir con las funciones fisiológicas de las abejas y para mantener su homeostasis a nivel individual (revisado por Brodschneider and Crailsheim, 2010). Sin embargo, el polen puede también contener compuestos potencialmente tóxicos para las abejas (revisado en Johnson, 2015), como ciertos carbohidratos, algunos almidones, flavonoides y ácido galacturónico presente en las pectinas (Barker, 1977; Reinhard *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2014). Resulta evidente entonces, que la homeostasis a nivel individual y colonial no depende simplemente de una nutrición adecuada sino también de la capacidad de detoxificar estos compuestos potencialmente tóxicos presentes en el polen, función realizada por la abeja mismo, su comunidad bacteriana e interacciones sociales, entre otros factores (Engel and Moran, 2013c; revisado por Johnson, 2015; Powell *et al.*, 2014).

Las abejas nodrizas son los principales individuos adultos consumidores de polen de la colmena (Crailsheim, 1990b). Una vez que el polen ingerido arriba al intestino medio, su contenido es liberado, absorbido y transportado por la hemolinfa hacia los cuerpos grasos (Kroon *et al.*, 1974; Zheng *et al.*, 2019). Los nutrientes almacenados en los cuerpos grasos son movilizados hacia las glándulas hipofaríngeas donde son utilizados para sintetizar jalea real, compuesto transferido mediante trofalaxis a larvas, reina y obreras (Crailsheim, 1992; Crailsheim *et al.*, 1992; Amdam & Omholt, 2003). De esta forma, el polen ingerido es procesado y administrado a los restantes individuos de la colmena. Además, las abejas nodrizas mediante la actividad de trofalaxis contribuyen a la adquisición y establecimiento de la microbiota intestinal de las abejas (Powell *et al.*, 2014). Esta microbiota intestinal está ampliamente caracterizada, es estable y conservada. Se ha reportado, que ciertas especies bacterianas tienen la capacidad de procesar compuestos como el ácido galacturónico y las pectinas (Engel *et al.*, 2012).

En el capítulo 1 de esta tesis se reportó que las abejas recién emergidas alimentadas con el polen polifloral 1, presentaron una alta mortalidad en la primera etapa de vida. Esto podría deberse a que ese polen contenía compuestos potencialmente tóxicos y a que

debido a las condiciones de cría de las abejas recién emergidas (ausencia de abejas nodrizas que pudieran procesar ese polen o transferirle la comunidad microbiana típica de las abejas), éstas no lograrán sobrevivir frente al consumo de dichos compuestos. En base a lo expresado, se plantea como hipótesis que la presencia de una microbiota intestinal característica de las abejas en términos de abundancia y diversidad, así como la interacción con abejas nodrizas en la primera etapa de la vida de la abeja son necesarias para sobrevivir al consumo de compuestos potencialmente tóxicos del polen. El objetivo de este capítulo fue analizar el efecto de la microbiota intestinal y de las interacciones con abejas nodrizas en la supervivencia, fisiología y microbiota intestinal de abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico.

6.2. Estrategia experimental

Para cumplir con el objetivo, se realizaron dos ensayos. En el primero de ellos se utilizaron abejas de entre 0 y 4 días de vida las cuales se incubaron con abejas nodrizas y se alimentaron con polen polifloral o con jarabe de sacarosa (control). La utilización de abejas de entre 0 y 4 días respondió a que, debido a la época del año, no era posible obtener el número necesario de abejas recién emergidas. Se analizó la supervivencia diaria acumulada de las abejas sometidas a ambos tratamientos. Por otro lado, el objetivo del segundo ensayo fue analizar el efecto de las interacciones con las abejas nodrizas y de la suplementación con contenido intestinal en abejas recién emergidas alimentadas con el polen polifloral. Para esto, se criaron abejas recién emergidas en condiciones de laboratorio, se alimentaron con polen polifloral y se dividieron en grupos. Un grupo se mantuvo como control, a otro grupo de abejas se le colocaron abejas nodrizas, mientras que al tercer grupo de abejas se lo suplementó con contenido intestinal proveniente de abejas nodrizas. Se analizó la supervivencia diaria acumulada de las abejas. Además, se tomaron muestras de abejas a los 4 y 10 días de vida para analizar la expresión de distintos genes: 1) *vg*, con el objetivo de analizar si el polen consumido es asimilado por los distintos grupos de abejas, 2) *him* y *ppo*, para evaluar si los distintos tratamientos afectan el sistema inmune humoral y celular, respectivamente, 3) gen putativo de la senesionina N oxigenasa (enzima potencialmente involucrada en la detoxificación de alcaloides pirrolizidínicos), para descartar si los desencadenantes de la mortalidad pudieron haber sido estos compuestos, 4) *cyp9* (gen involucrado en la detoxificación de cumafós) (Mao *et al.*, 2011), debido a que se encontraron trazas de este acaricida, y 5) se analizó el nivel de infección del DWV como marcador sanitario. Por último, a los 4 días de vida se tomaron muestras de los intestinos de las abejas para analizar las diferencias en la comunidad microbiana intestinal de las abejas sometidas a los distintos tratamientos.

6.3. Metodología

6.3.1. Dieta utilizada

En este ensayo se empleó el polen polifloral 1, previamente caracterizado como se describe en el capítulo 1 de esta tesis. Se analizó desde el punto de vista nutricional (porcentaje de proteínas, lípidos y aminoácidos), la presencia de los pesticidas comúnmente utilizados en agricultura y apicultura en nuestro país, y también se analizó la presencia de virus, según se describe en las secciones 5.3.1 y 5.3.7.

6.3.2. Ensayo 1: Efecto de las abejas nodrizas en la supervivencia de abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico

Este ensayo se realizó a fines del otoño de 2015 en el *Bee Research Laboratory* (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA), y se utilizaron abejas de entre 0 y 4 días de edad. Para su colecta, se tomaron tres marcos de cría operculada pronta para emerger de tres colmenas de abejas *A. mellifera* del *Bee Research Laboratory* (USDA). Dichos marcos se sacudieron en un recipiente de forma que las abejas cayeran en el mismo y se esperó a que las abejas de mayor edad volaran. Las abejas restantes, cuya edad se estima entre 0 y 4 días, se utilizaron en los ensayos (abejas focales). Las abejas colectadas se colocaron en grupos de 90 abejas por jaula y se dividieron en dos tratamientos (4 réplicas por tratamiento): i) alimentación con jarabe de sacarosa al 50% (control), y ii) alimentación con jarabe de sacarosa y polen polifloral 1.

A su vez, en cada jaula de ambos tratamientos se colocaron 9 abejas nodrizas de 6 días de edad (proporción 1 nodriza cada 10 abejas). Las abejas nodrizas fueron incluidas debido a que se ha reportado que cumplen un rol importante en el procesamiento del polen para que las abejas recién emergidas lo puedan consumir (Powell *et al.*, 2014). Para su colecta, 7 días previos a comenzar el ensayo y colectar las abejas focales, se tomaron cuadros con cría operculada próxima a emerger. Dichos marcos se incubaron a $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 70% de humedad. A las 24 horas se colectaron las abejas emergidas, se marcaron en el tórax con pintura Uni-Posca (1,8-2,5 mm) y se retornaron a sus respectivas colmenas. A los 7 días las abejas marcadas se recuperaron de las colmenas, y se introdujeron en las jaulas junto con las abejas focales. Las jaulas se incubaron a

32±1°C y 70% de humedad. Las abejas se alimentaron *ad libitum* y el alimento se cambió a diario para que estuviera siempre fresco. Se monitorearon las abejas diariamente y se registró la mortalidad.

En la figura 26 se presenta un esquema del diseño experimental del ensayo.

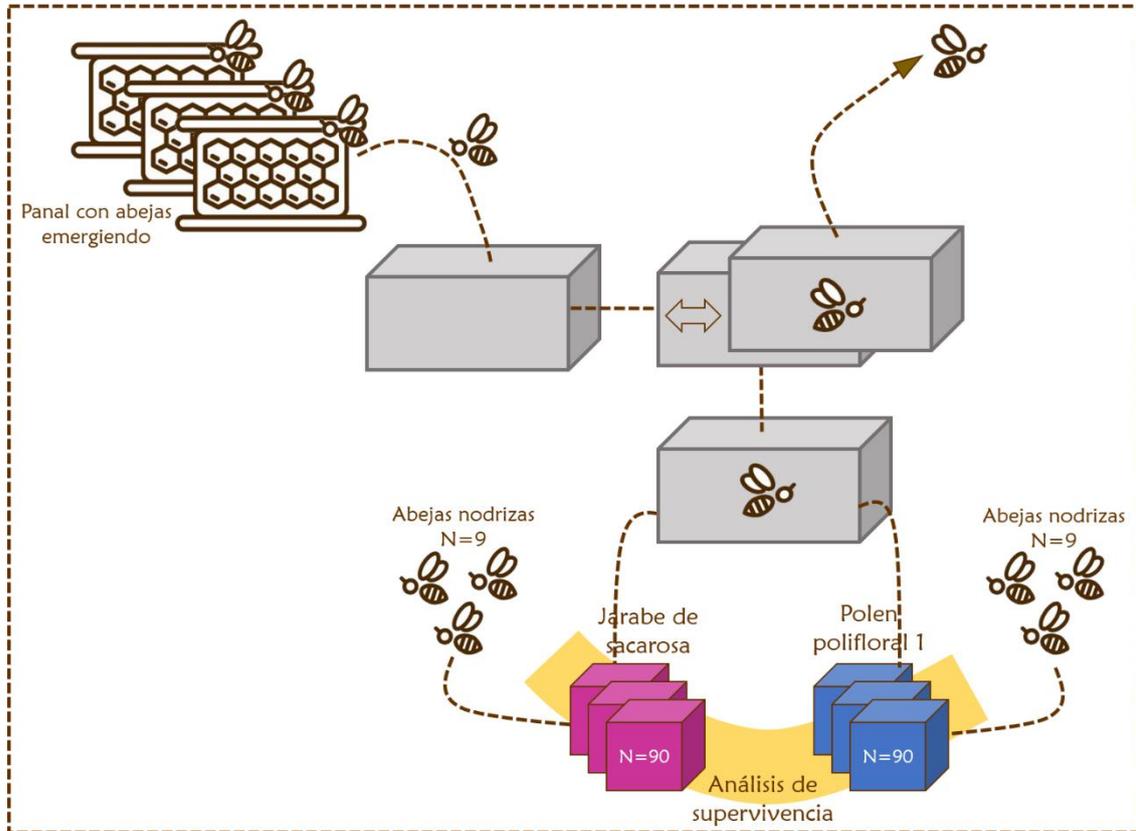


Figura 26. Esquema del diseño experimental del Ensayo 1: Efecto de las abejas nodrizas en la supervivencia de abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico (polen polifloral 1).

6.3.3. Ensayo 2: Efecto de la microbiota intestinal y de las abejas nodrizas en abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico

Este ensayo se realizó a principios de otoño de 2016 en la sección Etología de Facultad de Ciencias, UdelaR (Montevideo, Uruguay). Se utilizaron abejas recién emergidas (abejas focales) provenientes de colmenas ubicadas en el departamento de Canelones, Uruguay. Estas abejas se colectaron según se describe en la sección 5.3.2. Las abejas se colocaron en jaulas en grupos de 70 abejas por jaula y se dividieron en 4 tratamientos (3 réplicas por tratamiento): i) alimentación con jarabe de sacarosa al 50% y polen polifloral 1 (control), ii) alimentación con jarabe de sacarosa y polen polifloral 1, y acompañamiento por abejas nodrizas (colectadas según se describe en la sección 6.3.2), en una relación de 1 abeja nodriza por cada 2 abejas focales, proporción recomendada para asegurar que se dé trofalaxis entre ambos grupos de abejas (Powell *et al.*, 2014), iii) alimentación con jarabe de sacarosa y polen polifloral 1, y acompañamiento con abejas nodrizas (colectadas según se describe en la sección 6.3.2) en una relación de 1 abeja nodriza por cada 10 abejas focales. Esta proporción se incluyó con el objetivo de evaluar la magnitud de los efectos de la trofalaxis en relación con el tratamiento ii, y iv) alimentación con jarabe de sacarosa suplementado con el contenido intestinal de abejas nodrizas y polen polifloral 1. El contenido intestinal se obtuvo a partir de abejas nodrizas vivas, colectadas de acuerdo a lo expresado en la sección 6.3.2. Se extrajo el intestino de 5 abejas con pinza estéril, y se homogeneizaron en 2 ml de jarabe de sacarosa al 50%. Esta dosis se administró cada 48 h a cada una de las jaulas. Una vez consumida por completo, se continuó con la administración de jarabe de sacarosa.

Tanto el jarabe como el polen se administró *ad libitum* y el alimento se cambió cada 48 h. Todas las jaulas se monitorearon a diario, se removieron las abejas muertas y se registraron en una planilla de datos. Por otro lado, se tomaron muestras de abejas a tiempo 0, a los 4 y 10 días post emergencia para analizar la expresión de genes vinculados a la fisiología de las abejas, y a los 4 días post emergencia para analizar la estructura y diversidad de su comunidad microbiana intestinal. Para cada uno de estos análisis se colectaron 10 abejas por tratamiento (3, 3 y 4 abejas de cada jaula).

En la figura 27 se presenta un esquema del diseño experimental del ensayo.

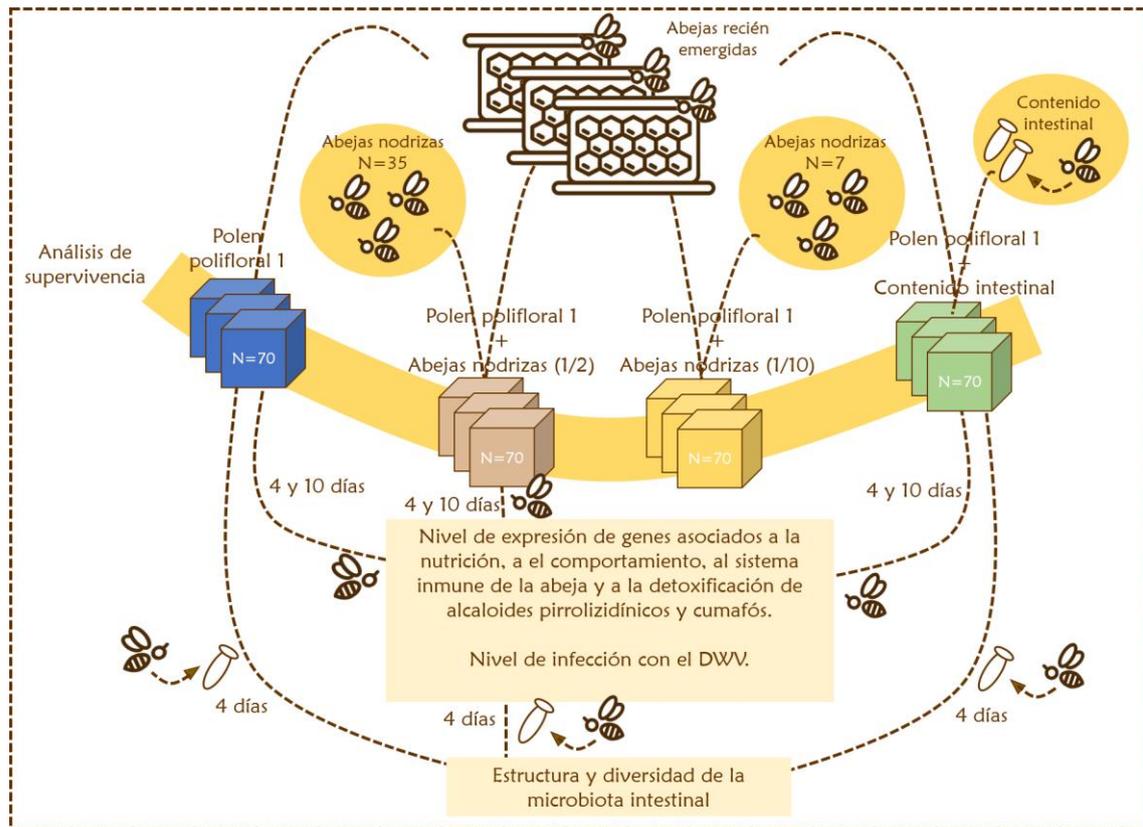


Figura 27. Esquema del diseño experimental del Ensayo 1: Efecto de las abejas nodrizas en la supervivencia de abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico

6.3.4. Extracción de ARN de abejas

Las abejas se homogeneizaron individualmente en tubos conteniendo 300 mg de perlas de cerámica, 600 μ l de buffer RLT y 6 μ l de β -mercaptoetanol a una velocidad de 5,5 m/s durante 1 min en un equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA). El homogeneizado obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 3 min y el sobrenadante se transfirió a la columna de digestión de ADN genómico provista por el *RNeasy Plus mini kit* (Qiagen, Alemania). Posteriormente, se siguieron los pasos pautados por el fabricante para finalizar con la extracción de ARN. Con el fin de digerir posibles restos de ADN genómico que pudieran haberse filtrado en la columna, se añadió un paso de digestión de ADN genómico adicional utilizando la enzima DNase I (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se retrotranscribió a ADNc utilizando el *High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems,

Lithuania). El ADNc obtenido se diluyó al décimo en agua destilada estéril y se conservó a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

6.3.5. Análisis de la expresión génica

Se analizó la expresión de los genes que codifican para la Vg, Him, Ppo, citocromo P450 (Cyp9) y un gen candidato de la senecionina N oxigenasa (Pa) (enzima potencialmente involucrada en la detoxificación de alcaloides pirrolizidínicos), y el nivel de infección con el DWV utilizando los cebadores vgF-R, himF-R, ppoF-R, cyp9F-R, pa1F-R y dwvF-R, respectivamente (Tabla 1, Apéndice 1). Los cebadores pa1F-R se diseñaron en el marco de esta tesis. Para esto, se realizó en primer lugar una búsqueda bibliográfica de posibles genes candidatos a estar involucrados en la detoxificación de alcaloides pirrolizidínicos. Se encontró un gen en el genoma de las abejas *A. mellifera* anotado como senecionina N oxigenasa, potencialmente vinculado a la detoxificación de alcaloides. Se alinearon las secuencias disponibles en el NCBI para dicho gen y se seleccionó la zona más conservada y con contenido medio de GC. Se diseñaron dos juegos de cebadores (PA1-F, PA1-R y PA2-F, PA2-R) utilizando el software Primer 3 Plus. Una vez puestas a punto las reacciones, los productos obtenidos se mandaron a secuenciar al servicio de secuenciación de MacroGen (Korea del Sur) y se comprobó la identidad de los productos. En base a la especificidad obtenida se seleccionó el juego de cebadores PA1 para ser utilizado en los análisis. Las condiciones de reacción consistieron en 10 μ l de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, UK), 0,3 μ M de cada cebador y 2 μ l de ADNc en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de ciclado consistieron en 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 60 seg a 60°C (en el caso de la amplificación del cyp9q2, 30 seg a 56°C y 30 seg a 60°C). Con el fin de comprobar la identidad de los productos se incluyó una curva de desnaturalización elevando la temperatura de 65 a 95°C. Todas las reacciones se corrieron por triplicado, y se incluyó una curva estándar que consistió en 5 puntos de dilución 1/5 de una mezcla de los ADNc obtenidos en el experimento y controles negativos. Para la normalización de los resultados se utilizó la media geométrica de la expresión de los genes que codifican para la β -actina y RPS5, utilizando los cebadores B-act F y R y RPS5 F y R (Tabla 1, Apéndice 1). Dichos genes se analizaron en corridas independientes y todas las reacciones se

realizaron en un equipo de PCR en tiempo real CFX96 Touch™ Real Time PCR System (Biorad).

Los resultados obtenidos en ambos experimentos se analizaron utilizando el método descrito por Pfaffl (2001), utilizando como grupo calibrador a las abejas muestreadas a tiempo 0 (recién emergidas).

6.3.6. Extracción de ADN de la comunidad microbiana intestinal de las abejas

Para la extracción de ADN intestinal de las abejas se siguió el protocolo propuesto por Powel y colaboradores (2014). Las abejas se anestesiaron con frío, se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito al 1% y se extrajeron los intestinos utilizando una pinza estéril. Los intestinos de 10 abejas se homogeneizaron en tubos conteniendo 300 mg de perlas de cerámica, 728 μ l de buffer CTAB al 2% y 20 μ l de Proteinasa K (20mg/ml) a 6,0 m/seg durante 30 seg en un equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA). Posteriormente, se adicionaron 2 μ l de β -mercaptoetanol y se repitió el paso de homogenización a igual velocidad durante 2 min. Las muestras se colocaron en hielo durante un minuto y se repitió el último paso de homogenización. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 56°C y 750 μ l del lisado se transfirió a un nuevo tubo conteniendo igual volumen de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:25:1). Dicha mezcla se homogeneizó por inversión y se colocó en hielo durante 2 min. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C y se transfirió 700 μ l de la fase superior a un nuevo tubo conteniendo 700 μ l de isopropanol y 70 μ l de acetato de sodio 3 M. Con el fin de precipitar el ADN, se incubaron las muestras durante 30 min a -20°C y se centrifugaron a 14.000 rpm por 30 min a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 14.000 rpm por 3 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Luego de evaporado el etanol (durante 30 min aproximadamente) el sedimento se resuspendió en 40 μ l de agua durante toda la noche a 4°C. El ADN obtenido se cuantificó en NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) y se estandarizaron las muestras en una concentración de 10 ng/ μ l.

6.3.7. Análisis de la comunidad microbiana intestinal de las abejas

Las muestras de ADN se enviaron al servicio de secuenciación masiva de la Universidad de Texas (Austin, USA) donde se secuenció la región V4 del ADN que codifica para el ARNr 16 S bacteriano utilizando la plataforma Illumina MiSeq y 250 ciclos *paired-end*.

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó empleando el software QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). En una primera instancia se unieron las lecturas pareadas utilizando el método de “*multiple join*”. Posteriormente, se seleccionaron las secuencias de mejor calidad identificando y eliminando las quimeras mediante el *software* Usearch 6.1. Se seleccionaron *de novo* las unidades taxonómicas operativas (OTUs) utilizando la opción *uclust* (Edgar, 2010) a las cuales se les asignó una taxonomía utilizando la base de datos de *Greengenes* con un nivel de similitud de 97%. Se eliminaron las secuencias que presentaron similitud con mitocondrias y cloroplastos, y aquellas OTUs con menor frecuencia que 3 (*singletons*). Posteriormente, se exploraron las curvas de rarefacción de las OTUs observadas en función de la profundidad del análisis y las muestras se normalizaron en función de aquella que presentó menor número de secuencias.

6.3.8. Análisis estadísticos

6.3.8.1. Supervivencia diaria

Se construyeron curvas de supervivencia según el método de Kaplan-Meier (Bland & Altman, 1998) y las diferencias entre los distintos tratamientos se analizó mediante el test Logrank y Wilcoxon *a posteriori* corregido por Bonferroni (Bland & Altman, 2004), con un nivel de confianza del 95%. En ambos casos se utilizó el Software R Studio (R Studio Team, 2016).

6.3.8.2. Expresión génica y nivel de infección

Se analizó el efecto de los tratamientos en la expresión de distintos genes vinculados a la fisiología de las abejas y el nivel de infección con el DWV. Debido a que se tomaron muestras de abejas provenientes de distintas jaulas, los datos se analizaron utilizando Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) (paquete `{lme4}`) (Bates *et al.*, 2015; R Studio Team, 2016). Se consideró el nivel de expresión de los genes y la infección con

DWV como variables de respuesta, el tratamiento (polen polifloral 1, polen polifloral 1 + abejas nodrizas o polen polifloral 1 + contenido intestinal) y el tiempo (días 4 y 10) como efectos fijos, y la jaula como efecto aleatorio. Se utilizó la distribución gamma y la función de conexión log.

6.3.8.3. Microbiota intestinal

Para estimar la diversidad alfa de las distintas muestras se calculó el índice de diversidad de Shannon). Las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante el Test de ANOVA. Con el fin de evaluar el efecto de los distintos tratamientos en la composición de la comunidad microbiana intestinal, se construyeron matrices de disimilitud *weighted* Unifrac (por abundancia de OTUs) las cuales se utilizaron para calcular las diferencias en la comunidad microbiana intestinal mediante el test de PERMANOVA corriendo 2000 permutaciones.

Por otro lado, con el objetivo de visualizar la distribución espacial de las muestras se construyeron gráficos de *Non-metric multidimensional dimensional scaling* (NMDS). Se determinó el mejor número de agrupamientos para esa representación con la función NbClust utilizando la distancia euclideana y el método de k-means. La asociación entre los tratamientos y el ordenamiento espacial de las muestras se determinó con la función envfit (Oksanen *et al.*, 2017).

Por último, se determinaron las diferencias en la abundancia relativa de las distintas OTUs entre los tratamientos mediante el software DESeq2 (Love *et al.*, 2014).

Todos los análisis se realizaron empleando el Software R Studio, considerando un nivel de confianza del 95% (R Studio Team, 2016).

6.4. Resultados

6.4.1. Ensayo 1: Efecto de las abejas nodrizas en la supervivencia de abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico

Las abejas de 0 a 4 días de edad alimentadas sólo con jarabe de sacarosa sobrevivieron como máximo 60 días, mientras que las que recibieron polen sobrevivieron hasta 80 días. La supervivencia diaria acumulada fue significativamente mayor en las abejas alimentadas con polen polifloral 1 (Log Rank test $p \leq 0,001$) (Fig. 28).

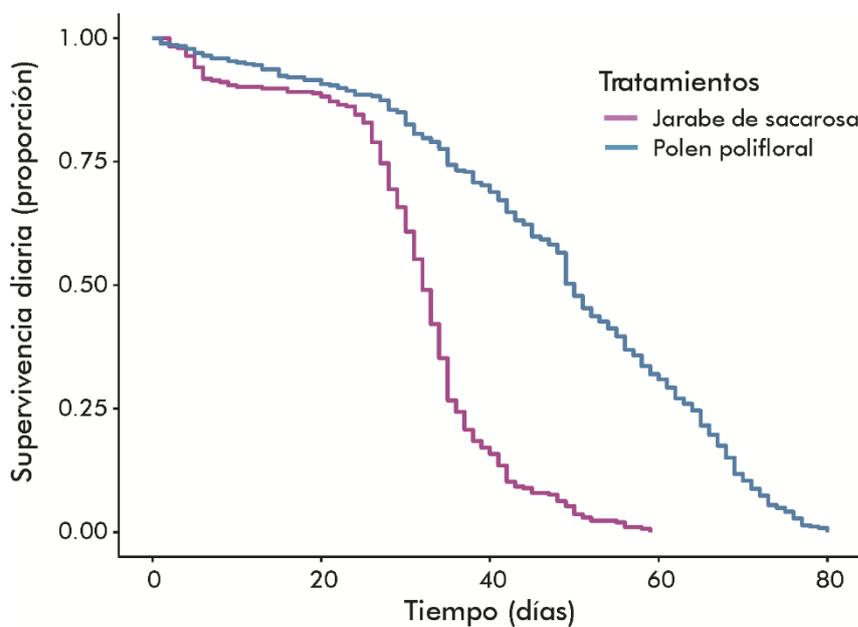


Figura 28. Supervivencia diaria acumulada de las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa y polen polifloral 1. La curva de supervivencia se construyó mediante el método de Kaplan Meier.

6.4.2. Ensayo 2: Efecto de la microbiota intestinal y de las abejas nodrizas en abejas alimentadas con polen potencialmente tóxico

6.4.2.1. Supervivencia diaria

En este segundo ensayo se profundizó en el posible rol de las abejas nodrizas en la supervivencia de las abejas recién emergidas.

Se encontró que las abejas recién emergidas acompañadas por nodrizas en una relación 1:2 sobrevivieron significativamente más que las abejas pertenecientes a los otros tratamientos (Wilcoxon test: polifloral 1+nodrizas 1:2 - polifloral 1+nodrizas 1:10, $p=0,03$; polifloral 1+nodrizas 1:2 – polifloral 1+suplementación con contenido intestinal, $p=0,003$; polifloral 1+nodrizas 1:2 – polifloral 1, $p\leq 0,001$) (Fig. 29). Por otro lado, la supervivencia de las abejas acompañadas por nodrizas en una relación 1:10 fue similar a las abejas suplementadas con contenido intestinal (Wilcoxon test, $p=0,99$) (Fig. 29), y en ambos casos la supervivencia fue mayor que el grupo de abejas control (sin tratamiento) (Wilcoxon test, polifloral 1+nodrizas 1:10 – polifloral 1, $p\leq 0,001$; polifloral 1 + suplementación con contenido intestinal - polifloral 1, $p\leq 0,001$) (Fig. 29).

A los 7 días de edad las abejas suplementadas con contenido intestinal presentaron un aspecto húmedo y movimientos lentos. Debido a la sospecha de que parte del jarabe había caído del alimentador mojando a las abejas, y que esto afectaría su supervivencia, se dio por finalizado el ensayo para este grupo. De este modo, para este tratamiento, se discontinuó el registro diario de mortandad y no se tomaron muestras de abejas de 10 días para los análisis moleculares.

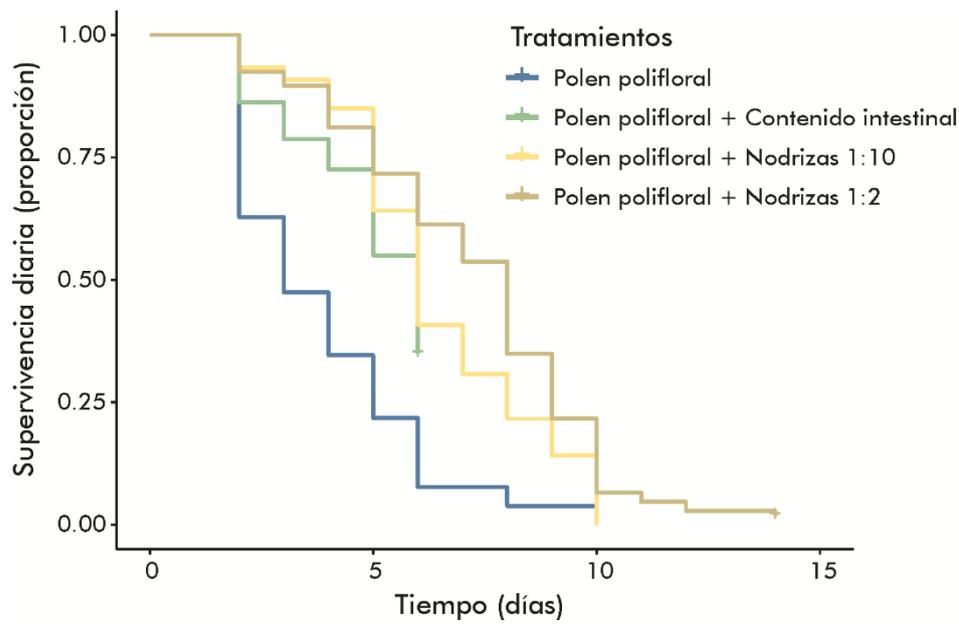


Figura 29. Supervivencia diaria acumulada de las abejas alimentadas con polen polifloral 1, polen polifloral 1 y acompañadas por abejas nodrizas en una relación 2:1, polen polifloral 1 y acompañadas por abejas nodrizas en una relación 10:1, y polen polifloral 1 suplementadas con contenido intestinal. La curva de supervivencia se construyó mediante el método de Kaplan Meier. Las pequeñas líneas perpendiculares indican datos censados.

6.4.2.2. Expresión de genes vinculados a la fisiología de las abejas y nivel de infección con DWV

Con el objetivo de profundizar los distintos mecanismos fisiológicos que podrían haberse visto afectados por la ingesta del polen polifloral 1, se analizó la expresión de los genes *vg*, *pa1*, *cyp9*, *him* y *ppo*, y los niveles de infección con el DWV en los grupos de abejas alimentados con polen polifloral 1, alimentados con polen polifloral 1 y con abejas nodrizas, y alimentados con polen polifloral 1 y suplementadas con contenido intestinal.

Los niveles de expresión de *vg* se vieron afectados significativamente por el tratamiento: la administración de polen polifloral 1 junto con abejas nodrizas o junto con contenido intestinal aumentó la expresión de este gen respecto a la alimentación únicamente con polen polifloral 1 (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 30; Tabla 5, Apéndice 2). No se observó un efecto del tiempo ni de la interacción entre el tiempo y tratamiento en los niveles de expresión de este gen (Tabla 5, Apéndice 2).

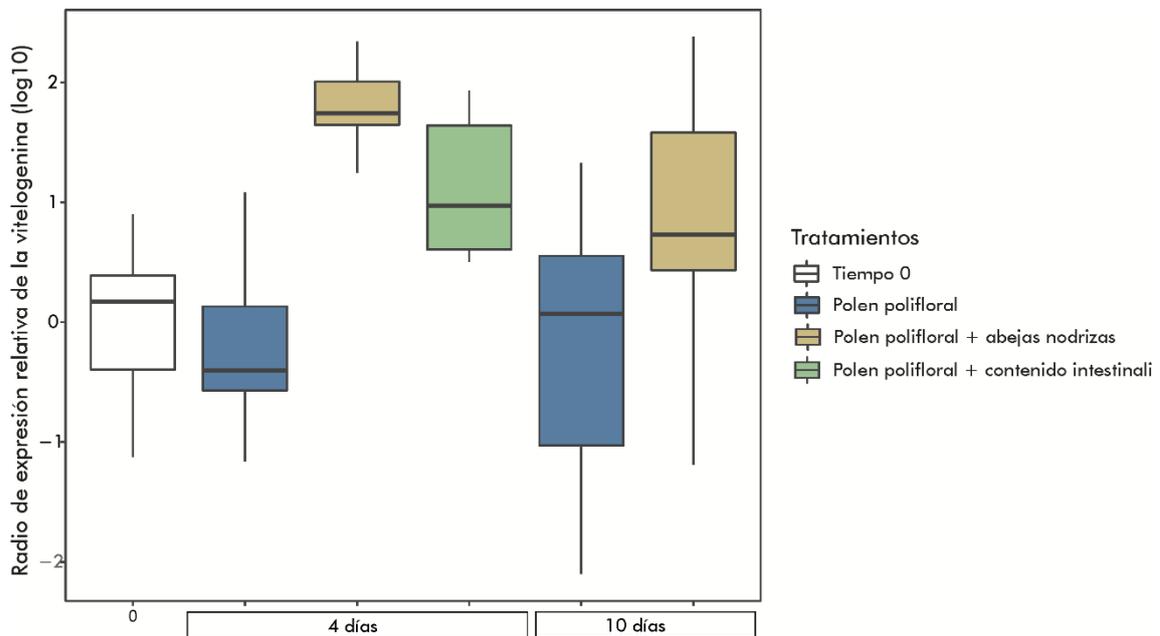


Figura 30. Expresión relativa del gen *vg* de las abejas muestreadas a los 4 y 10 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

Por otro lado, los niveles de expresión de *pa1* no se vieron afectados ni por los tratamientos, ni por el tiempo, ni por la interacción entre ambas variables (GLMM, $p \geq 0,05$) (Fig. 31; Tabla 5, Apéndice 2). Similares resultados se obtuvieron para el nivel de expresión de *cyp9* (GLMM, $p \geq 0,05$) (Fig. 31; Tabla 5, Apéndice 2).

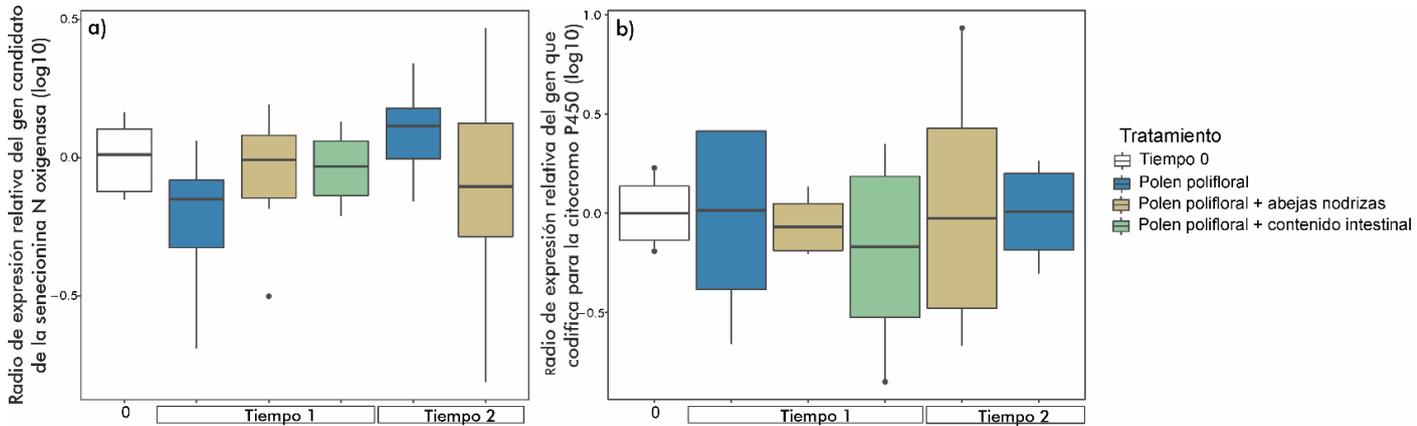


Figura 31. Expresión relativa de los genes que codifican para la senescencia N oxigenasa (a) y para la citocromo P450 (b) de las abejas muestreadas a los 4 y 10 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los valores del eje y se encuentran en escala log₁₀. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

Los niveles de expresión de *him* aumentaron con el correr del tiempo (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 32; Tabla 5, Apéndice 2). No se observó un efecto del tratamiento ni de la interacción entre el tratamiento y el tiempo sobre esta variable (GLMM, $p \geq 0,05$) (Fig. 32; Tabla 5, Apéndice 2).

Por otro lado, los niveles de expresión de *ppo* no se vieron afectados por el tratamiento (GLMM, $p \geq 0,05$) (Fig. 32; Tabla 5, Apéndice 2). En este caso, no fue posible amplificar el gen en las muestras tomadas a los 10 días de vida.

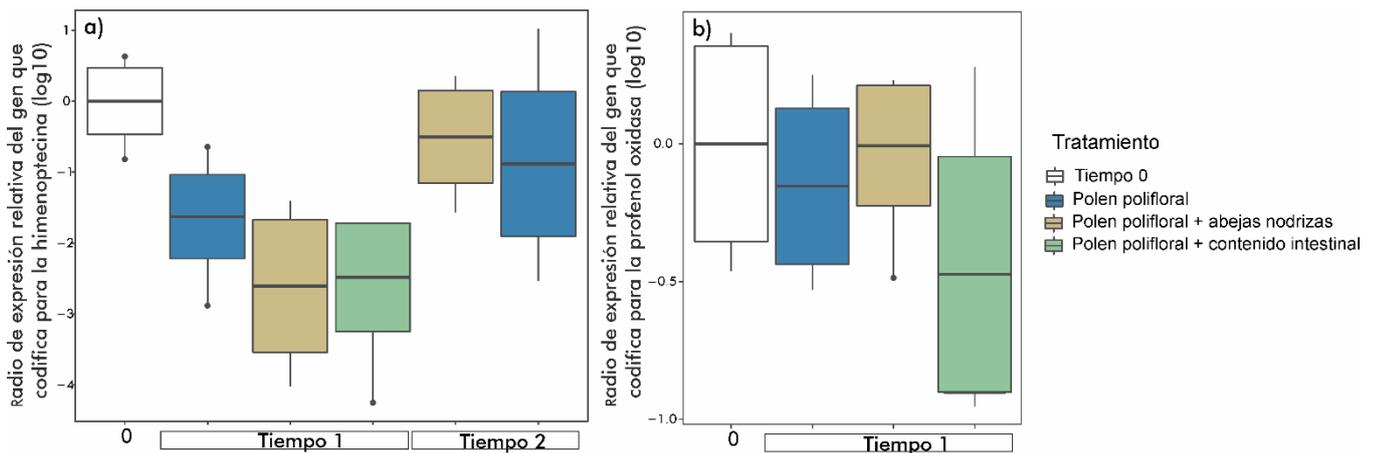


Figura 32. Expresión relativa de los genes a) *him* de las abejas muestreadas a los 4 y 10 días y de b) *ppo* de las abejas muestreadas a los 4 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los valores del eje y se encuentran en escala log₁₀. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

Por último, los niveles de infección con el DWV se vieron afectados por el tratamiento, ya que las abejas pertenecientes al tratamiento de polen polifloral 1 presentaron mayor nivel de infección con este virus en comparación a las alimentadas con el mismo polen y acompañadas por abejas nodrizas y suplementadas con contenido intestinal (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 33; Tabla 5, Apéndice 2). En este caso tampoco se logró amplificar el nivel del DWV al día 10.

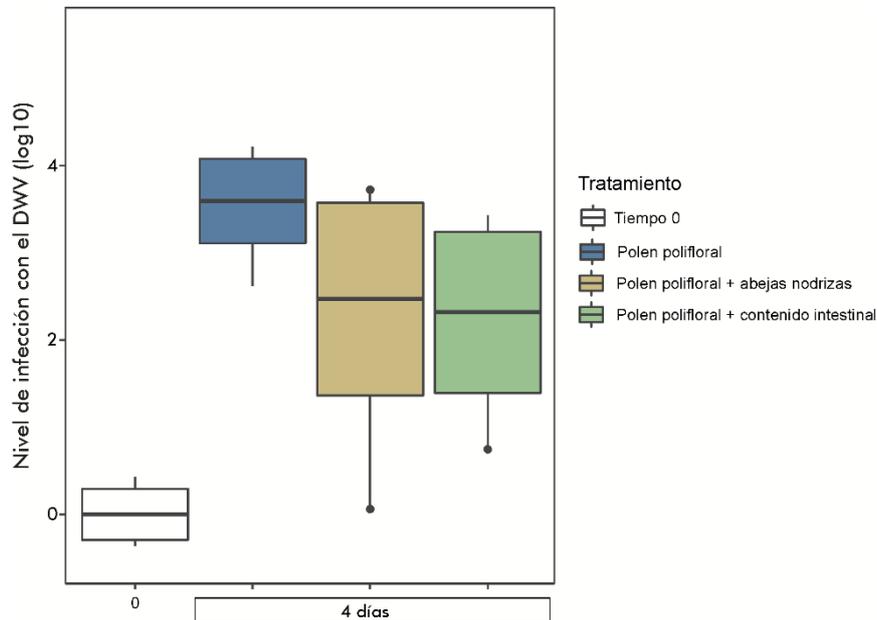


Figura 33. Nivel de infección con el Virus de alas deformes (DWV) de las abejas muestreadas a los 4 días de edad pertenecientes a los distintos tratamientos. Los valores del eje y se encuentran en escala log10. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

6.4.2.3. Comunidad microbiana intestinal de las abejas

Se obtuvieron un total de 170.184 lecturas, de las cuales un 99% (170.166) pasaron los umbrales de calidad establecidos. Los datos se rarificaron según la muestra con menor número de lecturas, dando un total de 11.473 lecturas por muestra. Los análisis finales se realizaron con un total de 169.743 lecturas únicas y 55 OTUs (con un 97% de identidad).

Posteriormente se comparó la comunidad microbiana intestinal asociada a los tratamientos de polen polifloral 1, polen polifloral 1 + abejas nodrizas (1:2) y polen polifloral 1 + contenido intestinal a los 4 días de vida.

Por un lado, se analizó la diversidad intra-tratamientos mediante el estimador de Shannon, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA $p=0,98$). Por otro lado, se comparó la diversidad bacteriana entre los distintos tratamientos teniendo en cuenta matrices de disimilitud entre muestras (weighted Unifrac). En este caso tampoco se observaron diferencias entre tratamientos (PERMANOVA $p=0,57$).

Con el objetivo de visualizar el arreglo espacial de las muestras, se construyó un gráfico de NMDS. El mejor número de agrupamientos fue 3, con las muestras de abejas suplementadas por contenido intestinal por un lado, una muestra de abejas acompañadas por nodrizas por otro lado y las alimentadas solamente con polen polifloral 1 junto con una de las muestras de abejas acompañadas por nodrizas por otro lado. Por lo tanto, si bien las muestras representativas de los distintos tratamientos tienden a diferenciarse, no es posible observar un ordenamiento claro de las muestras según los distintos tratamientos (Fig. 34). Dicha falta de estructuración se respalda por los resultados obtenidos del análisis de asociación entre el ordenamiento y los tratamientos (envfit $p=0,17$).

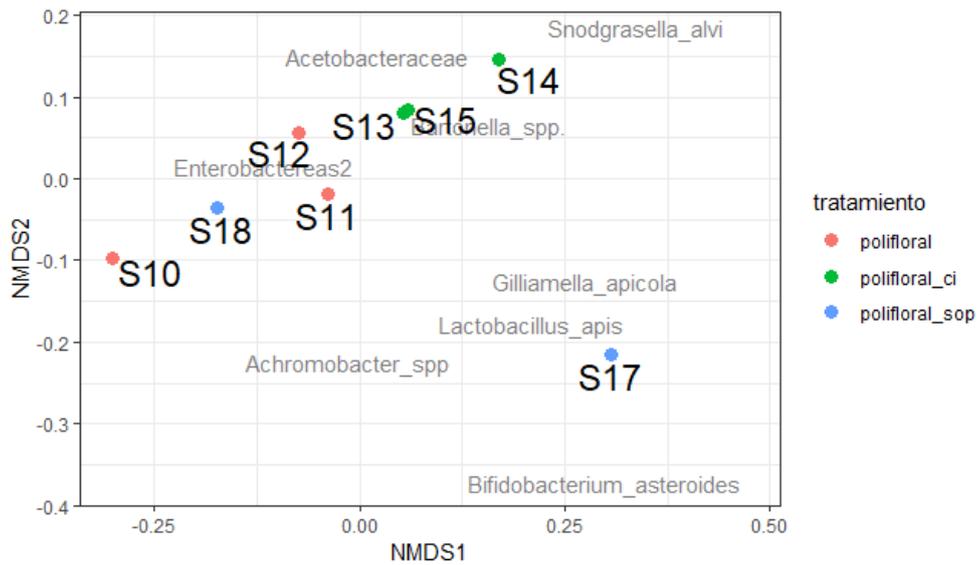


Figura 34. Non-metric multidimensional dimensional scaling (NMDS) de las muestras pertenecientes a los tratamientos de abejas alimentadas con polen polifloral 1 (polifloral), polen polifloral 1 y suplementadas con contenido intestinal (polifloral_ci), y alimentadas con polen polifloral 1 y abejas nodrizas (polifloral_sop).

La comunidad microbiana intestinal de las abejas pertenecientes a los tres tratamientos estuvo conformada principalmente por *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Lactobacillus apis* (*Lactobacillus Firm-5*), *Bifidobacterium asteroides*, y miembros de la familia Acetobacteraceae así como por miembros de los géneros *Bartonella spp.*, *Achromobacter spp.*, *Acinetobacter spp.* y *Klebsiella spp.* (Fig. 35).

Según los análisis de Deseq2, las abejas alimentadas con polen polifloral 1 y acompañadas de nodrizas presentaron significativamente mayor abundancia relativa de *Lactobacillus apis* (Deseq2, $p \leq 0,05$, foldchange=1,98), y *Bifidobacterium asteroides* (Deseq2, $p \leq 0,05$, foldchange=1,52) y menor abundancia de Enterobacteraceae (Deseq2, $p \leq 0,05$, foldchange=-8,08) y Acetobacteraceae (Deseq2, $p \leq 0,05$, foldchange=-1,85) en comparación a las alimentadas con polen polifloral 1. A la vez, las abejas alimentadas con polen polifloral 1 y acompañadas por nodrizas presentaron menor abundancia de Enterobacteraceae en comparación a las alimentadas con el mismo polen y suplementadas con contenido intestinal (Deseq2, $p \leq 0,05$, foldchange=24,48). Finalmente, las abejas alimentadas con polen polifloral 1 y suplementadas con contenido

intestinal presentaron menor abundancia relativa de Enterobacteracea (Deseq2, $p \leq 0,05$, foldchange=5,28) en comparación a las alimentadas con el mismo polen.

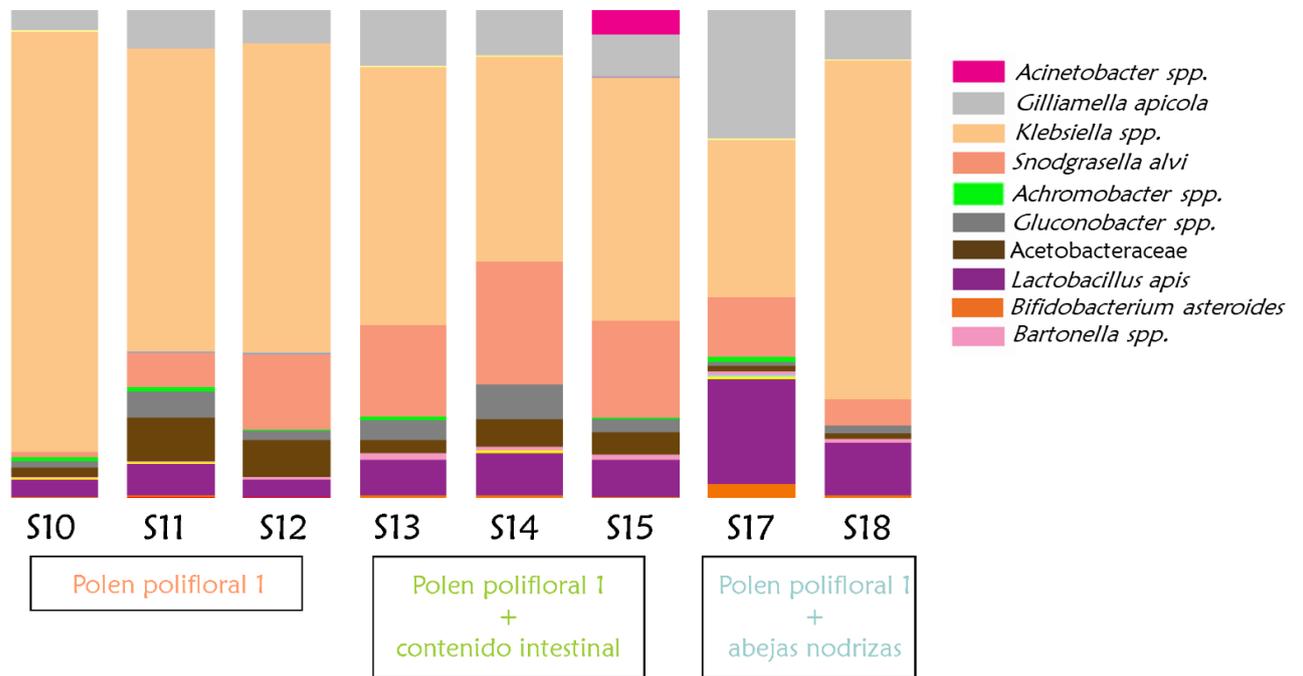


Figura 35. Abundancia relativa de los grupos bacterianos dominantes en las muestras de abejas de los distintos tratamientos.

6.5. Discusión

La nutrición de las abejas se basa en el consumo de polen, fuente de proteínas, lípidos y minerales, además de los carbohidratos aportados por el néctar. Es por esto, que una mayor diversidad de polen tiene el potencial de suministrar a las abejas una mayor variedad de nutrientes que el polen monofloral. Sin embargo, el polen polifloral puede también aumentar las probabilidades de contener compuestos potencialmente tóxicos para las abejas (Barker, 1977; Reinhard *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2014), y los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis evidencian esta posibilidad. Abejas recién emergidas criadas en condiciones de laboratorio, carecen de las interacciones sociales que se dan con el resto de los integrantes de la colmena. Dichas interacciones implican, entre otros factores, contacto entre abejas recién emergidas y nodrizas. Estas últimas alimentan a las abejas recién emergidas con jalea real rica en proteínas y lípidos y contribuyen con la adquisición de la comunidad microbiana intestinal de las abejas (Powell *et al.*, 2014). A su vez, esta comunidad microbiana intestinal ayuda en el procesamiento del polen suministrándole a las abejas distintos nutrientes, compite con potenciales patógenos y activa la respuesta inmune de las abejas, entre otras funciones (Koch & Schmid-Hempel, 2011; Engel *et al.*, 2012; Kwong *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2019). De esta forma, resulta evidente que, en las condiciones de cría de laboratorio, están ausentes distintos mecanismos que se dan en la naturaleza y que son claves para el mantenimiento de la homeostasis individual. En este estudio se planteó como objetivo analizar el efecto de las interacciones entre abejas recién emergidas y nodrizas, y con la comunidad microbiana intestinal.

Los motivos por los cuales el polen polifloral 1 puede haber causado la alta mortalidad observada son múltiples. Como un primer abordaje se consideró que posiblemente la presencia de componentes tóxicos en la muestra de polen, como alcaloides pirrolizidínicos, altas concentraciones de pectinas que pudieran haber en el polen, o cumafós (acaricida de uso común en apicultura), podrían haber sido los responsables de tal mortalidad. De estos compuestos, es posible descartar el efecto negativo del cumafós, ya que las abejas de los tres tratamientos presentaron similar nivel de expresión del gen que codifica para la enzima involucrada en su detoxificación. El gen que codifica para la enzima potencialmente vinculada a la detoxificación de los alcaloides pirrolizidínicos también mostró similar nivel de expresión entre las abejas de los distintos tratamientos, por lo que probablemente también se puede desestimar el efecto de estos compuestos.

Sin embargo, debido a que los cebadores fueron diseñados en base a una secuencia putativa para esta enzima, esta conclusión debe ser tomada con cautela hasta tanto se confirme la función de esta enzima. Por último, no se observaron diferencias en la abundancia de *Gilliamella apicola*, grupo asociado al metabolismo de las pectinas (Engel *et al.*, 2012), por lo que posiblemente estos compuestos tampoco hayan sido los responsables de la mortalidad observada. De esta forma, se descartan estos tres componentes como responsables de la muerte de las abejas. Es importante resaltar que, a pesar de haber analizado varios pesticidas en el polen, no es posible descartar que la alta mortalidad observada no esté asociada también a la presencia de otros pesticidas no analizados. Sin embargo, considerando que los resultados obtenidos demuestran que las interacciones con las nodrizas son claves y que estas interacciones tienen miles de años de evolución, es posible desestimar que el desencadenante de la mortalidad observada sea un pesticida cuyo uso en el ambiente o en las colmenas es reciente en términos evolutivos.

Por otro lado, el análisis de la comunidad microbiana intestinal de las abejas (independientemente del tratamiento) mostró una alta abundancia de miembros de las Enterobacteraceae. Este resultado fue inesperado ya que si bien estas bacterias han sido identificadas en la microbiota intestinal de las abejas, son considerados patógenos oportunistas y consecuentemente su abundancia es baja en comparación a la abundancia de los miembros del “core” (revisado por Raymann & Moran, 2018). Esto estaría indicando que la alimentación con el polen polifloral 1, no permitió que las abejas adquirieran su comunidad microbiana intestinal característica y promovió una mayor abundancia de estas bacterias potencialmente patógenas, lo cual pudo haber desencadenado la alta mortalidad observada. De hecho, las abejas recién emergidas acompañadas por nodrizas fueron las que presentaron menor abundancia relativa de las Enterobacteraceae y las que más sobrevivieron, seguidas por las suplementadas por contenido intestinal y por las alimentadas únicamente con polen polifloral 1, grupo de abejas con menor supervivencia.

Además, el beneficio del acompañamiento de abejas nodrizas se manifestó también en la adquisición de una comunidad microbiana con mayor abundancia de microorganismos funcionalmente claves para la fisiología de las abejas como *Bifidobacterium ateroides* y *Lactobacillus apis* (Engel *et al.*, 2012; Moran *et al.*, 2012;

Zheng *et al.*, 2019). Llama la atención que las abejas suplementadas con contenido intestinal sobrevivieron más que las alimentadas solamente con polen polifloral 1 pero presentaron similares abundancias de estas bacterias claves para la fisiología de las abejas. Esto puede deberse a que las diferencias en la abundancia relativa de estas bacterias no sean tan marcadas como para identificarlas según la estrategia metodológica propuesta. Si bien los efectos positivos de este tratamiento no se manifestaron en la composición de la microbiota intestinal, sí lo hicieron en la supervivencia de la abeja y en la asimilación de los nutrientes de este polen (mayores niveles de expresión de la *vg*).

Por último, los mayores niveles de DWV observados en abejas alimentadas solo con polen polifloral podría ser una consecuencia del debilitamiento fisiológico asociado al consumo de este polen y la incapacidad de metabolizar los compuestos potencialmente tóxicos o que estas abejas poseen menor abundancia de bacterias potencialmente benéficas para las abejas, promoviendo una mayor respuesta inmune o produciendo algún producto antiviral.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia de las interacciones entre abejas recién emergidas y nodrizas en la supervivencia y nutrición de las abejas, ampliando los ya conocidos beneficios de la eusocialidad. Dichas interacciones fueron cruciales para adquirir la comunidad microbiana intestinal característica de las abejas (a pesar de haber sido criadas en condiciones de laboratorio). Además, es importante tener en cuenta que las abejas nodrizas realizan trofalaxis activa con las recién nacidas y las alimentan con jalea real (Moritz & Crailsheim, 1987). La producción de la jalea real depende del procesamiento del polen y el transporte de los nutrientes obtenidos hacia las glándulas hipofaríngeas. Por lo tanto, posiblemente también las abejas recién emergidas hayan sido alimentadas con jalea real por las nodrizas acompañantes, obteniendo de esta forma los nutrientes del polen polifloral 1 procesados y reproduciendo en cierta medida lo que sucede en la naturaleza.

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la interacción entre abejas recién emergidas y nodrizas cumplirían un rol clave en la nutrición. Dicha función se manifestaría mediante el procesamiento de compuestos del polen y/o contribuyendo al establecimiento de una comunidad microbiana intestinal característica de las abejas en términos de abundancia y diversidad. Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis planteada en este capítulo: la presencia de una

microbiota intestinal característica de las abejas en términos de abundancia y diversidad, así como la interacción con abejas nodrizas en la primera etapa de la vida de la abeja son necesarias para alcanzar una mayor supervivencia.

7. CAPÍTULO 3- Efecto del estrés nutricional en el estado sanitario, fortaleza y productividad de colonias de abejas melíferas

7.1. Introducción

En los últimos años ha crecido la evidencia que demuestra que el estrés nutricional de las abejas tiene efecto a varios niveles (fisiológico, inmunológico, comportamental, sanitario), por lo que esta temática se ha posicionado en un lugar central al momento de buscar las causas de pérdida de poblaciones de abejas melíferas registrada en la última década (Alaux *et al.*, 2010, 2011a; Carreck & Neumann, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013; Requier *et al.*, 2018; Gray *et al.*, 2019). Diferentes autores han abordado este problema empleando como estrategia el estudio del efecto de distintas dietas sobre parámetros fisiológicos y sanitarios en abejas confinadas en jaulas y condiciones controladas de laboratorio (Alaux *et al.*, 2010; Castelli, 2017; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013; Capítulo 1 de esta tesis). Dicha estrategia resulta sumamente útil ya que permite disociar el efecto de las distintas variables en las abejas, pero también posee sus limitantes ya que las abejas no pueden desplegar sus comportamientos sociales, carecen de los estímulos provenientes de la cría y no realizan las tareas de campo. Por otro lado, otros autores han realizado abordajes a nivel de campo, mediante la evaluación de la asociación entre datos históricos de la superficie de suelo plantado y su diversidad, con el porcentaje de pérdidas de colonias (Naug, 2009; Clermont *et al.*, 2015; Smart *et al.*, 2016b) o con la fortaleza y estado sanitario de las mismas (Dolezal *et al.*, 2016; Smart *et al.*, 2016a; b).

La hipótesis de este capítulo consiste en que el estrés nutricional impacta la fortaleza, estado sanitario, productividad y supervivencia de las colonias a corto y a mediano plazo. Dichos efectos pueden ser mitigados luego de transcurrido el período de estrés nutricional.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto del estrés nutricional en la fortaleza, estado sanitario y productividad de colonias de abejas, y en segunda instancia el efecto de la suplementación invernal con polen polifloral, en colmenas sometidas a estrés nutricional, como estrategia para mejorar la fortaleza y salud de las colmenas. Para esto se utilizaron a las plantaciones de *E. grandis* como escenario de estrés nutricional ya que allí las abejas carecen de una oferta variada de polen. Además, el

polen de *Eucalyptus* spp. posee bajo porcentaje de lípidos (Arien *et al.*, 2015), en general no poseen un buen balance de aminoácidos (Somerville, 2001) y su porcentaje de proteínas varía de acuerdo a la etapa de floración (Invernizzi *et al.*, 2011a), no alcanzando en ciertas circunstancias el mínimo porcentaje de proteínas requerido por las abejas para suplir sus necesidades metabólicas (Kleinschmidt & Kondos, 1976). Las colonias ubicadas en estas plantaciones durante el período de floración se debilitan sensiblemente, se infectan con altos niveles de *N. ceranae* y presentan alta mortalidad invernal si las mismas no son retiradas tempranamente de dichos ambientes (Invernizzi *et al.*, 2011b; Mendoza *et al.*, 2013, 2014). Esto brinda un ambiente propicio para estudiar la interacción entre el estrés nutricional y la salud de las abejas en condiciones de campo.

7.2. Estrategia experimental

En el presente capítulo se presentan dos ensayos de campo. En el primero de ellos se estableció un apiario experimental en una plantación de *E. grandis* en Rivera, conformado por 62 colmenas homogéneas provenientes de reinas hermanas. En dichos ambientes convergen dos de las principales problemáticas asociada a las pérdidas de colmenas: la desnutrición y el debilitamiento sanitario. Todas las colmenas estuvieron expuestas al estrés nutricional de dichos ambientes, pero la mitad de las colmenas se suplementaron con tortas de polen polifloral con el objetivo de mitigar dicho estrés. Durante el período de floración de *E. grandis* se monitoreó cada 15 días la fortaleza de las colmenas, el nivel de infección con los principales patógenos que afectan a las abejas, el contenido de proteínas de las abejas, la diversidad de polen colectado, y culminado el período de floración se estimó la cantidad de miel producida. Posteriormente, dicho apiario se trasladó a INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). Con el objetivo de analizar el efecto del estrés nutricional a mediano plazo, se monitoreó mensualmente durante el invierno la fortaleza de las colmenas y en la primavera siguiente se determinaron los niveles de infección con los principales patógenos.

El segundo ensayo de este capítulo tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la suplementación invernal con tortas de polen polifloral de colmenas que estuvieron sometidas a estrés nutricional en una plantación de *E. grandis*. Para esto, colmenas que estuvieron en dicho ambiente durante su período de floración, se trasladaron a INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay) y se suplementaron mensualmente durante el invierno con tortas de polen polifloral. Se determinó la fortaleza y estado sanitario una vez que las colonias se retiraron de la plantación de *E. grandis* (tiempo 0) y en primavera (tiempo final), monitoreándose mensualmente durante el invierno su fortaleza.

7.3. Metodología

7.3.1. Ensayo 1: Impacto del estrés nutricional en la fortaleza, salud y productividad de colonias de abejas melíferas. Estrategia experimental

Se utilizaron 62 colmenas con reinas hermanas jóvenes de la misma edad localizadas en INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). Las colmenas se estandarizaron en 6 panales con cría, 2 láminas de cera labrada y 2 panales con miel. Previo al comienzo del ensayo (13 de febrero de 2015), se trataron contra el ácaro *V. destructor* con Amitraz (Apilab Lab, Argentina) de forma de igualar y minimizar sus niveles de infección. El 5 de marzo de 2015 se realizó el primer muestreo (muestreo 1). Se estimó la fortaleza de la colmena y se evaluó si las colmenas presentaban alguna sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas, según se describe en la sección 7.3.5 (tiempo 0, inicio del ensayo). Todas las colmenas se trasladaron el 10 de marzo de 2015 a una plantación de *E. grandis* ubicada en el departamento de Rivera, Uruguay (31°15'51,73''S; 55°39'23,80''O). Las colmenas se dividieron al azar en dos grupos de 31 colmenas cada uno: grupo M y P. Las colmenas del grupo M se alimentaron únicamente del polen disponible en el ambiente, mientras que las colmenas del grupo P se suplementaron con 500 gr de polen polifloral cada 15 ± 2 días durante el período de floración de la plantación de *E. grandis* (10 de marzo, 26 de marzo, 10 de abril, 24 de abril y 7 de mayo de 2015). Por lo tanto, el grupo P constituyó el grupo control a la hora de evaluar los efectos del estrés nutricional. Coincidiendo con las fechas de suplementación, se muestrearon las colmenas (muestréos 2, 3, 4 y 5), se estimó la fortaleza y se registró la sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas. Una vez finalizada la floración, se estimó la producción de miel como porcentaje de cara de cuadro cubiertos por miel (Delaplane *et al.*, 2013) y dichos cuadros se removieron de las colmenas para su cosecha. Posteriormente, las colmenas se trasladaron nuevamente a INIA La Estanzuela (15 de mayo de 2015). Con el fin de evaluar la efectividad de la suplementación a mediano plazo, durante los meses de junio, julio y agosto, se visitó el apiario mensualmente. En dichas visitas se registró la fortaleza de las colonias y sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas, y el 30 de setiembre de 2015 se realizó el último muestreo (muestreo 6) registrando también la fortaleza de las colonias y la sintomatología (Fig. 36).

Los muestreos consistieron en la colecta de:

- Abejas pecoreadoras ($N \geq 120$) para cuantificar el nivel de infección con *Nosema* spp., y determinar la especie de *Nosema* spp. (sección 7.3.6). Para esto, se taparon las piqueras de las colmenas y las abejas que retornaban del campo fueron colectadas en frascos y almacenadas en etanol hasta el momento de ser analizadas. Debido a que los muestreos llevaban todo un día de trabajo y que el momento del día puede influir en la edad en que las abejas salen a pecorear, estas muestras se tomaron a mitad de mañana (luego de las 10 am) en todas las colmenas, y en el correr del día se realizaron los restantes muestreos. Los análisis correspondientes a estas muestras se realizaron en 10 colmenas por grupo elegidas al azar. Los niveles de infección se determinaron en todos los muestreos, mientras que la determinación de la especie de *Nosema* spp. se determinó en los muestreos 1, 5 y 6.
- Abejas nodrizas ($N \geq 40$) para la cuantificación de los niveles de infección con virus ARN (sección 7.3.7). Estas abejas se trasladaron vivas al laboratorio y se sacrificaron a -80°C para evitar la degradación del ARN viral.
- Abejas nodrizas (entre 200 y 250) para la cuantificación de *V. destructor* (sección 7.3.8). Dichas abejas se muestrearon de al menos tres sitios distintos del nido de cría y se conservaron en etanol hasta el momento de ser analizadas.
- Polen superficial ubicado en las celdas circundantes a la cría. Esta muestra se utilizó para determinar la diversidad del polen que las abejas estaban consumiendo según el protocolo descrito en la sección 5.3.1.1. Dichos análisis se realizaron en 10 colmenas de cada grupo escogidas al azar y en los muestreos 1 a 5. Estas muestras de polen se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser analizados.
- Abejas nodrizas ($N \geq 100$) para análisis de proteína corporal. Dichos análisis se realizaron en 10 colmenas de cada grupo escogidas al azar y en los muestreos 1 a 5 según el método descrito en la sección 7.3.5.3. Estas muestras de polen se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser analizados.

Adicionalmente, con el fin de conocer el polen disponible en el ambiente, se instalaron en el mismo sitio tres colmenas externas al ensayo. Dichas colmenas provenían de la misma zona que las colmenas del ensayo, tenían reinas hermanas y de la misma edad y también se estandarizaron en cuanto a reservas de cría y alimento. En cada visita al apiario (muestreos 2, 3, 4 y 5) se colocaron trampas de polen de piquera y se muestreó el polen corbicular colectado durante el día de muestreo. Se analizó su origen botánico en los distintos muestreos y el porcentaje de proteínas (según se describe en la sección 5.3.1). Posteriormente, las 4 muestras de polen (una por muestreo) se mezclaron conformando una muestra representativa de todo el transcurso del período de floración del *E. grandis*. Dicha muestra se dividió en dos fracciones: una fracción conteniendo toda la diversidad de polen colectado por las abejas (polen ambiental, PA) y otra fracción en la cual se separó el polen de *E. grandis* (polen de *E. grandis*, PE). Esta división se realizó para analizar la calidad nutricional del polen disponible en el ambiente durante el período de floración y específicamente del polen de *E. grandis*. Es por esto, que ambas fracciones se enviaron al laboratorio CBO (Brasil) para analizar su proporción de aminoácidos y contenido de lípidos, según se describe en la sección 5.3.1.3.

El diseño experimental se esquematiza en la figura 36 y un resumen de los análisis realizados se presentan en la Tabla 2 del Apéndice 1.

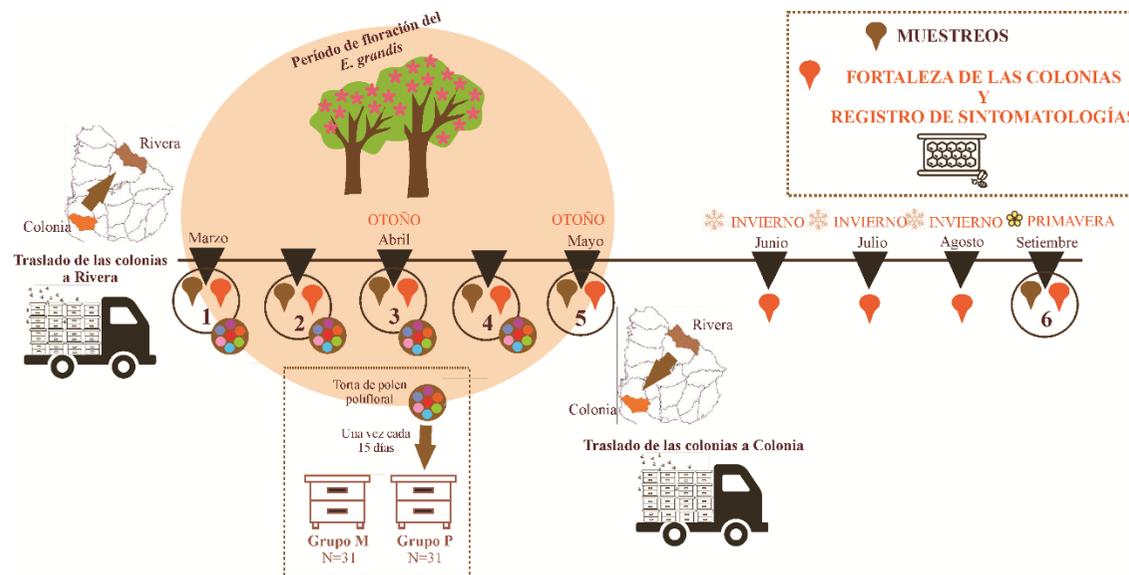


Figura 36. Diseño experimental del Ensayo 1. Efecto de la suplementación con polen polifloral en colonias sometidas a estrés nutricional en su fortaleza y estado sanitario a corto y mediano plazo.

7.3.2. Ensayo 2: Impacto de la suplementación invernal con polen en colonias que estuvieron sometidas a estrés nutricional. Estrategia experimental

En este ensayo se evaluó el efecto de la suplementación con polen polifloral en colonias que estuvieron previamente sometidas a estrés nutricional durante su estadía en una plantación de *E. grandis*. Para esto, se trabajó con un apiario de 22 colmenas que estuvieron en una plantación de *E. grandis* del departamento de Rivera, Uruguay (31°15'51,73''S; 55°39'23,80''O). Previo al traslado de estas colmenas a INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay) (7 de mayo de 2017), se estimó la fortaleza de las colonias según se describe en la sección 7.3.5 y se tomaron muestras de abejas para cuantificar los niveles de infección con *Nosema* spp., con los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV, y con el ácaro *V. destructor*. Una vez reinstalado el apiario en INIA La Estanzuela, las colmenas se dividieron al azar en dos grupos de 11 colmenas cada uno. Las colmenas de un grupo (MP) recibieron 500 gr de polen polifloral mensualmente, mientras que las colonias del otro grupo (MM) permanecieron como control sin recibir suplemento de polen. Se visitó el apiario una vez por mes durante todo el invierno (mayo, junio, julio y agosto) y en cada visita se estimó la fortaleza de las colonias, se evaluó la presencia de sintomatologías de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas y las colmenas del grupo MP recibieron su suplementación con polen polifloral. En setiembre, se realizó el muestreo final para determinar los niveles de infección de los patógenos nombrados previamente (30 de setiembre de 2017), y se registró la fortaleza y sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas.

El diseño experimental se esquematiza en la figura 37.

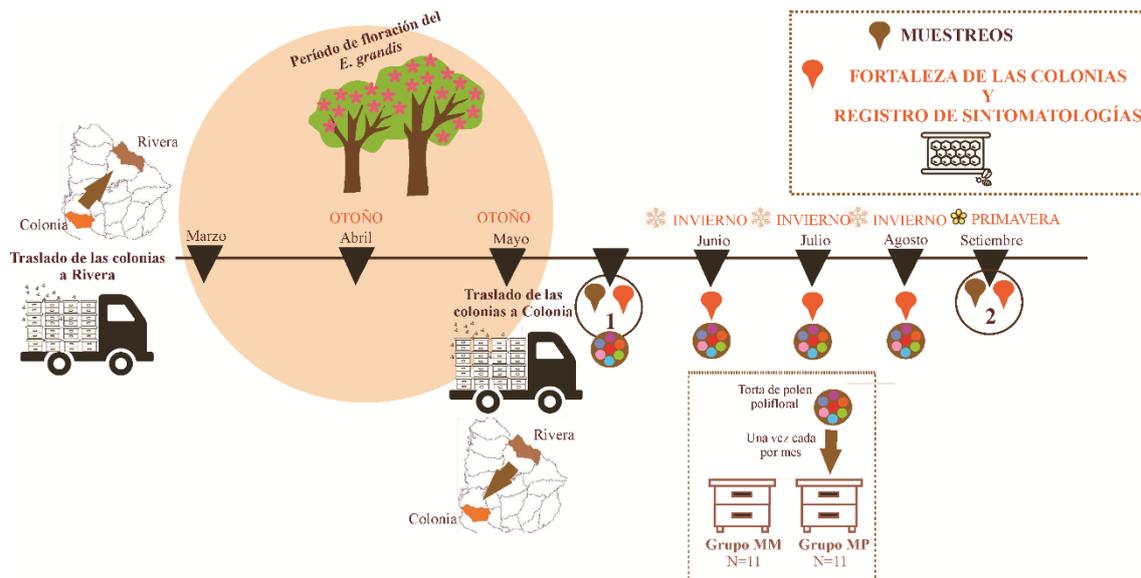


Figura 37. Diseño experimental del Ensayo 2. Efecto de la suplementación con polen polifloral durante el invierno de colonias que estuvieron sometidas a estrés nutricional en una plantación de *Eucalyptus grandis*.

7.3.3. Colonias utilizadas en los ensayos

Todas las colonias utilizadas en los ensayos pertenecían a la sección Apicultura de INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). Dichas colmenas se formaron a partir de núcleos huérfanos de 4 cuadros a los que se les colocó una reina recién emergida. Para esto, en primavera (octubre de 2014) se criaron 80 reinas provenientes de una colmena de abejas *A. mellifera* “criolla” de nuestro país (híbrido entre *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica* y *A. mellifera scutellata*). Las reinas vírgenes se insertaron en los núcleos y aquellos cuyas reinas se fecundaron y mantuvieron durante el verano una postura constante y uniforme se utilizaron en los ensayos. De esta forma, quedaron conformados 62 colonias de abejas *A. mellifera* con reinas hermanas y producidas en la misma época.

7.3.4. Torta de polen polifloral

En este ensayo se utilizó el polen polifloral 1 colectado y procesado según se describe en la sección 5.3.1.

7.3.5. Fortaleza de las colonias

Con el objetivo de evaluar la fortaleza de las colonias, se utilizaron como parámetros indicadores la cantidad y calidad de la cría, cantidad de abejas adultas, porcentaje de proteína corporal de las abejas, reservas de polen y sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas. Dichos parámetros se estimaron por dos observadores independientes y los datos correspondientes se registraron en una planilla de datos.

7.3.5.1. Cantidad y calidad de cría

La población de cría en las colmenas se determinó mediante el método descrito en el Beebook (Delaplane *et al.*, 2013). Para esto, dos observadores independientes estimaron el porcentaje de cuadro cubierto por cría (incluyendo las etapas de huevo, larva y pupa). Teniendo en cuenta el área de cada cara de cuadro y la cantidad de celdas en dicha área, se calculó la cantidad de cría por colmena.

Por otro lado, la calidad de la cría de cada colmena se categorizó en “compacta” ($\leq 10\%$ de cría salteada), “salteada” (entre el 10 y 30% de cría salteada) y “muy salteada” (más del 30% de cría salteada), definiendo a la cría salteada como celdas de cría vacías dentro de un patrón homogéneo de postura.

7.3.5.2. Cantidad de población adulta

La cantidad de población adulta se estimó mediante una modificación del método subjetivo descrito en el Beebook (Delaplane *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta las características de las abejas africanizadas de nuestro país y su comportamiento de vuelo al retirar los marcos de la colmena, la población de abejas adultas se estimó como número de calles (espacio entre dos cabezales de cuadros) cubiertas por abeja. Para el análisis, se asumió que cada calle con abejas equivale a dos caras de cuadro cubiertas por abejas y considerando el área de cada cara de cuadro y la cantidad de abejas que entran en dicha área es posible estimar el número de abejas de la colmena según se recomienda en el Beebook. A pesar de la modificación del método, los resultados

obtenidos se corresponden con los obtenidos según el método original propuesto en el Beebook (Y. Mendoza, comunicación personal).

7.3.5.3. Porcentaje de proteína corporal

Este análisis se realizó a partir 100 abejas las cuales se desecaron a 60°C. El porcentaje de proteína corporal se determinó con respecto al total de materia seca mediante la técnica de digestión ácida de Kjeldahl (Somerville, 2001) en el laboratorio de Nutrición Animal de INIA La Estanzuela.

7.3.5.4. Reservas de polen

La cantidad de reservas de polen de las colmenas se categorizó en “Nivel 1” (más de cuatro caras de panal cubiertos por polen), “Nivel 2” (entre dos y cuatro caras de panal cubiertas por polen), “Nivel 3” (entre una y dos caras de panal cubiertas por polen), “Nivel 4” (menos de una cara de panal cubierta por polen) y “Nivel 5” (ausencia de reservas de polen).

7.3.5.5. Sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas

Se registró la aparición de síntomas característicos de distintas patologías como loque americana, loque europea y cría yesificada. Asimismo, se registró la aparición de cría salteada, opérculos irregulares y canibalismo.

7.3.6. Análisis de *Nosema* spp.

7.3.6.1. Nivel de infección de *Nosema* spp.

Existen distintos métodos para medir el nivel de infección con *Nosema* spp. La proporción de abejas infectadas con este microsporidio constituye el mejor indicador del estado de la colmena (Fries *et al.*, 2013b). Por tal motivo, 30 abejas por colmena se homogeneizaron individualmente en 200 μ l de agua destilada estéril y la presencia o ausencia de esporas de *Nosema* spp. se comprobó mediante visualización por

microscopía óptica al 400X (Microscopio Nikon Eclipse E200). El nivel de infección se determinó como la relación entre el número de abejas infectadas y el total de abejas analizadas. Complementariamente, se determinó el nivel de infección con este microsporidio como el número de esporas en un pool de abejas. Para esto, 60 abejas se homogeneizaron con 60 ml de agua destilada estéril durante 120 seg a máxima velocidad en un homogeneizador Stomacher 80 (LabSystem, Seward). Una alícuota se utilizó para cuantificar el número de esporas mediante conteo en cámara de Neubauer (Fries *et al.*, 2013b).

7.3.6.2. Determinación de la especie de *Nosema* spp.

Para la determinación de las especies de *Nosema* spp. presente en las colmenas, 20 abejas por colmena se homogeneizaron en 10 ml de buffer PBS estéril durante 120 seg a máxima velocidad en un homogeneizador Stomacher 80 (LabSystem, Seward). El líquido obtenido se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 min y el sedimento resultante se resuspendió en 2 ml de buffer PBS. La extracción de ADN se realizó a partir de 500 μ l de esta suspensión de esporas utilizando el *Purelink Genomic DNA minikit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones pautadas por el fabricante.

El ADN obtenido se utilizó como molde para la amplificación mediante multiplex PCR siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.3.7.3.

7.3.7. Nivel de infección con virus ARN a nivel colonial

Con el fin de determinar los niveles de infección con virus ARN, 20 abejas por colmena se homogeneizaron en 10 ml de buffer PBS frío a máxima velocidad durante 120 seg en un homogeneizador Stomacher 80 (LabSystem, Seward). El líquido obtenido se centrifugó a 1.200 rpm durante 10 min a 4°C para sedimentar los fragmentos de mayor tamaño y luego se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 15 min a 4°C (Anido *et al.*, 2016).

7.3.7.1. Extracción de ARN y retrotranscripción

El sobrenadante obtenido según la metodología descrita en la sección anterior (200 μ l) se utilizó para la extracción de ARN utilizando el *Purelink RNA/DNA minikit* (Invitrogen, USA). El ADN genómico co-purificado con el ARN (1 μ l) se digirió con *DNasa I Amp grade* (Invitrogen, USA) y el ARN se retrotranscribió a ADNc empleando el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Lithuania). El ADNc obtenido se diluyó al décimo en agua destilada estéril. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las instrucciones pautadas por los fabricantes.

7.3.7.2. PCR en tiempo real para la detección de virus ARN

El nivel de infección con los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV se determinó mediante qPCR utilizando los cebadores ABPV-F y R, BQCV-F y R, DWV-F y R y SBV-F y R (Tabla 1, Apéndice 1). Las reacciones de PCR y condiciones de ciclado se realizaron según se describe en la sección 5.3.7.4. En todas las reacciones se incluyeron controles positivos y una curva por triplicado conteniendo cinco puntos de dilución de una mezcla de todos los cDNA utilizados en el ensayo. El segundo punto de dilución de dicha curva se utilizó como intercalibrador de placas. Asimismo, para la normalización de los resultados necesaria para la cuantificación relativa de estos virus se utilizó la expresión de los genes de expresión constitutiva de las abejas β -actina y la proteína ribosomal S5 (RPS5) utilizando los cebadores B-act-F y R y RPS5-F y R (Tabla 1, Apéndice 1). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR System (Biorad). El nivel de infección de los virus se determinó mediante el método descrito por Pfaffl (2001), utilizando como grupo calibrador a los niveles de infección de las colmenas en el primer muestreo (previo al traslado de las mismas a la plantación de *E. grandis*).

7.3.8. Nivel de infección con *V. destructor*

La cuantificación de los niveles de infección con el ácaro *V. destructor* se realizó de acuerdo a lo sugerido en el Beebook (Dietemann *et al.*, 2013). Para esto, se colocaron entre 200 y 250 abejas en un frasco y se agitaron con etanol a 300 rpm durante 5 min. Posteriormente, se cuantificó el número de ácaros desprendidos. Dicho procedimiento se

repitió tres veces, extendiendo el tiempo de la tercera ronda de agitación a 10 min. Por último, se cuantificó el número de abejas y se calculó el porcentaje de infección de la colonia como la relación entre el número total de ácaros desprendidos en relación al total de abejas analizadas. Asimismo, se calculó el total de ácaros en fase forética de la colonia teniendo en cuenta el total de abejas de la colonia y el total de abejas infectadas con el ácaro según la metodología propuesta en el Beebook (Dietemann *et al.*, 2013).

7.3.9. Análisis estadísticos

En el ensayo 1, con el objetivo de analizar el efecto del tratamiento y tiempo en la fortaleza de las colonias, su diversidad de polen, el porcentaje de proteína corporal de las abejas, y los niveles de infección con *Nosema* spp, virus y *V. destructor* durante el período de estrés nutricional, se utilizaron modelos lineares generalizados mixtos generalizados (GLMM). Para esto, se consideró el tratamiento (M o P), el tiempo y la interacción entre ambas variables como efectos fijos, las colmenas como efectos aleatorios y las restantes variables como variables de respuesta. En el caso de la población de abejas adultas y de cría debido a que se trataron de conteos, se usó la distribución de poisson y la función de conexión log. En el caso de la diversidad de polen, el porcentaje de proteína corporal y los niveles de infección con *Nosema* spp., virus y *V. destructor* se utilizó la distribución gamma y la función de conexión log. En todos estos casos, se utilizó el paquete lme4 del software R Studio (paquete {lme4}) (Bates *et al.*, 2015; R Studio Team, 2016).

A su vez, se determinó la diferencia en los parámetros de fortaleza de las colonias y los niveles de infección con los distintos patógenos entre las colonias de los grupos M y P en los diferentes muestreos. Para esto, en una primera instancia se evaluó si las variables se ajustan a los criterios de estadística paramétrica mediante el análisis de su normalidad y homogeneidad de varianza con los tests de Kolmogorov Smirnov y de Levene, respectivamente (paquetes {nortest} y {car}) (Fox, 2016; R Studio Team, 2016). Para aquellos casos en los que las variables se ajustaron a los parámetros de estadística paramétrica se utilizó el Test de t, mientras que aquellas variables que no lo hicieron se analizaron mediante el test de Mann Whitney. Con el fin de evaluar la capacidad de recuperación de la fortaleza de las colonias en primavera se aplicaron estos mismos métodos.

Las diferencias en la calidad de la cría y reservas de polen entre ambos tratamientos se analizaron mediante el test de Chi² para cada nivel de clasificación de ambas variables. Las diferencias en la producción de miel entre ambos grupos de colmenas al finalizar el período de floración de *E. grandis* se analizaron mediante el Test de t.

Por otro lado, se analizó la diferencia en la proporción de pérdidas de colonias entre ambos grupos durante el período de estrés nutricional y durante el invierno para el ensayo 1 y para todo el ensayo 2 mediante el test de proporciones.

Por último, en el ensayo 1 se analizó la relación de la población de abejas adultas en función del tratamiento y de los niveles de infección con *Nosema* spp mediante un GLMM utilizando la variable tratamiento (M y P) y nivel de infección con *Nosema* spp. como efectos fijos, las colmenas como efecto aleatorio y la población de abejas adultas como variable de respuesta (paquete {lme4}) (Bates *et al.*, 2015; R Studio Team, 2016). Se utilizó la distribución gamma y la función de conexión log y los análisis se realizaron utilizando el paquete lme4 del software R Studio (paquete {lme4}) (Bates *et al.*, 2015; R Studio Team, 2016).

En el ensayo 2, para analizar los cambios en la población de abejas y cría asociados al tiempo y tratamiento se siguieron los mismos procedimientos que se describieron para el ensayo 1. En el caso de los niveles de infección con los distintos patógenos, se comparó la media o mediana según la naturaleza de los datos (Test de t o Mann Whitney, respectivamente). Esto se debió a que se trató únicamente de dos tiempos de muestreo.

7.4. Resultados

7.4.1. Torta de polen polifloral

Como se mencionó en el capítulo 1 de esta tesis, la torta de polen polifloral 1 se compuso por 23 especies de polen (Tabla 1). El polen de la torta presentó un porcentaje de proteína cruda de 26,31% y de lípidos de 3,72%, y presentó todos los aminoácidos esenciales para las abejas (Tabla 2). Se detectó la presencia de seis de los 33 pesticidas analizados cuyas concentraciones fueron todas cercanas al límite de detección de la técnica (Tabla 3). No se detectó la presencia de *N. apis*, *N. ceranae*, ni de los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV (resultados no mostrados).

7.4.2. Ensayo 1: Impacto del estrés nutricional en la fortaleza, salud y productividad de colonias de abejas melíferas

El objetivo de este ensayo fue analizar el efecto del estrés nutricional en la fortaleza, estado sanitario y productividad de colonias de abejas melíferas durante el período de floración del monte de *E. grandis* y a mediano plazo. Todas las colonias del ensayo se ubicaron en un monte de *E. grandis* (modelo de estrés nutricional) y a un grupo (P) se las suplementó con una torta de polen polifloral con el fin de mitigar los efectos de dicho estrés, mientras que las restantes colmenas (grupo M) solo tuvieron acceso al polen disponible en el entorno. Para evaluar la fortaleza de las colonias, se utilizaron como indicadores la cantidad de población de abejas adultas, cantidad y calidad de la cría, el porcentaje de proteína corporal de las abejas adultas, la cantidad de reservas de polen de las colonias y su sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas. Por otro lado, las variables utilizadas para medir el estado sanitario de las colonias fueron el nivel de infección con *Nosema* spp., con los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV y con el ácaro *V. destructor*.

7.4.2.1. Diversidad de polen y características nutricionales del polen disponible en la plantación de *Eucalyptus grandis*

El polen disponible en el ambiente de la plantación de *E. grandis* se compuso principalmente por polen proveniente de estos árboles, ya que su proporción fue superior al 85% en todos los muestreos (Tabla 4). El polen obtenido se dividió en dos

fracciones: la fracción PA contuvo toda la diversidad del polen colectado, mientras que la fracción PE contuvo polen únicamente de *E. grandis*.

Tabla 4. Origen botánico del polen polifloral y el polen disponible en el ambiente durante el período de floración de la plantación de *Eucalyptus grandis*

Familia	Nombre científico	Torta de polen polifloral %	Polen disponible en el ambiente			
			Muestreo 2 %	Muestreo 3 %	Muestreo 4 %	Muestreo 5 %
Amaryllidaceae	<i>Allium cepa</i>	0,7	-	-	-	-
Anacardiaceae	<i>Schinus longifolius</i>	0,1	-	-	-	-
Apiaceae	<i>Eryngium</i> spp.	6,7	-	-	-	-
Apiaceae	<i>Ammi viznaga</i>	2,9	-	-	-	-
Arecaceae	-	2,1	-	-	-	-
Asteraceae	<i>Baccharis</i> spp. 1	0,2	1,97	1,09	0,25	-
Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	-	0,12	10,6	0,15	-
Asteraceae	<i>Baccharis</i> spp. 2	-	-	-	12,9	0,65
Asteraceae	<i>Soliago chilensis</i>	0,5	5,98	0,06	0,25	-
Asteraceae	<i>T. Eupatorium bunifolium</i>	0,5	0,18	0,31	0,05	-
Asteraceae	<i>T. cirsium vulgare</i>	0,2	-	-	-	-
Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i>	0,2	-	-	-	-
Ch-Am	-	0,1	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Trifolium pratense</i>	22,5	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Lotus</i> spp.	36,1	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	3	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Trifolium rapens</i>	11,1	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	5,1	-	-	-	-
Lamiaceae	<i>Salvia</i> spp.	0,1	-	-	-	-
Myrtacea	<i>Eucalyptus</i> spp.	3,5	91,75	87,94	86,4	99,35
Onagraceae	<i>Ludwigia peploides</i>	0,8	-	-	-	-
Paoceae	-	1,3	-	-	-	-
Rhamnaceae	<i>Scutia buxifolia</i>	0,1	-	-	-	-
Scrophulariaceae	-	0,2	-	-	-	-
Unknown	-	2	-	-	-	-

El porcentaje de proteína cruda del PA varió durante el período de floración: el polen proveniente del muestreo 2 presentó un 26,1% de proteína cruda, el del muestreo 3 un 17,01% y el del muestreo 4 un 18,95%. Dicha variación se observó también en las muestras de PE, ya que presentaron un porcentaje de proteína cruda de 24,35% en el muestreo 2, 27,06% en el muestreo 3, 24,42% en el muestreo 4 y 19,29% en el muestreo 5.

El contenido de lípidos del PA fue de 0,96% y presentó todos los aminoácidos esenciales para las abejas (Tabla 5, Apéndice 2). Por otro lado, el contenido de lípidos del PE fue de 1,44% y también presentó todos los aminoácidos esenciales para las abejas.

Tabla 5. Porcentaje de aminoácidos con respecto al total de materia seca del polen polifloral 1, polen disponible en el ambiente y el polen de *Eucalyptus grandis*. Se destacan en gris los aminoácidos esenciales para la abeja.

Aminoácido	Porcentaje de aminoácidos (sobre el total de polen analizado)		
	Polen polifloral 1	Polen disponible en el ambiente	Polen de <i>E. grandis</i>
Ácido aspártico	1,92	1,43	1,69
Ácido Glutámico	1,79	1,59	1,88
Serina	0,99	0,81	0,94
Glicina	0,81	0,81	0,9
Histidina	0,45	0,4	0,44
Taurina	0,03	0,04	0,05
Arginina	0,94	1,13	1,18
Treonina	0,88	0,69	0,73
Alanina	1,07	0,95	1,05
Prolina	2,33	1,95	2,21
Tirosina	0,65	0,54	0,6
Valina	0,94	0,8	0,91
Metionina	0,33	0,31	0,34
Cisteína	0,21	0,19	0,21
Isoleucina	0,87	0,68	0,77
Leucina	1,37	1,15	1,31
Fenilalanina	0,75	0,65	0,73
Lisina	1,07	1,08	1,24
Triptofano	0,22	0,13	0,15

7.4.2.2. Cantidad y calidad de la cría

Al inicio del ensayo, las colmenas de ambos grupos presentaron similar población de cría (Mann Whitney U Test, $p=0,57$). Luego que las colmenas se instalaron en la plantación de *E. grandis*, se observó un efecto negativo del estrés nutricional, ya que las colonias del grupo M presentaron menor población de cría que las colmenas del grupo P siendo dicho efecto dependiente del tiempo (GLMM, $p\leq 0,05$) (Fig. 38; Tabla 8, Apéndice 2).

En particular, dicha diferencia se observa en los muestreos 2, 3 (Mann Whitney U Test, $p=0,003$) y 4 (Mann Whitney U Test, $p=0,02$) (Fig. 38; Tabla 9, Apéndice 2). La misma tendencia se observa en el muestreo 5 aunque no es estadísticamente significativa (Mann Whitney U Test, $p=0,28$) (Fig. 38; Tabla 9, Apéndice 2). Estos efectos se mantuvieron luego del período de estrés nutricional, ya que las colonias del grupo M presentaron menor población de cría que las colonias del grupo P durante junio (Mann Whitney U Test, $p=0,02$), julio (Mann Whitney U Test, $p=0,007$) y agosto (Mann Whitney U Test, $p=0,004$) (Fig. 38; Tabla 9, Apéndice 2).

Por otro lado, el tiempo también afectó la población de cría. Este efecto fue negativo ya que el número de cría disminuyó con el transcurso del tiempo entre marzo y julio (Fig. 38; Tabla 8, Apéndice 2). En la primavera se dio un aumento de la población de cría principalmente en las colonias del grupo P (Mann Whitney U Test, agosto-muestreo 6: $p\leq 0,001$), mientras que, si bien se observa un aumento en este parámetro en las colonias del grupo M, el mismo es marginalmente significativo (Mann Whitney U Test, agosto-muestreo 6: $p=0,07$) (Fig. 38; Tabla 9, Apéndice 2).

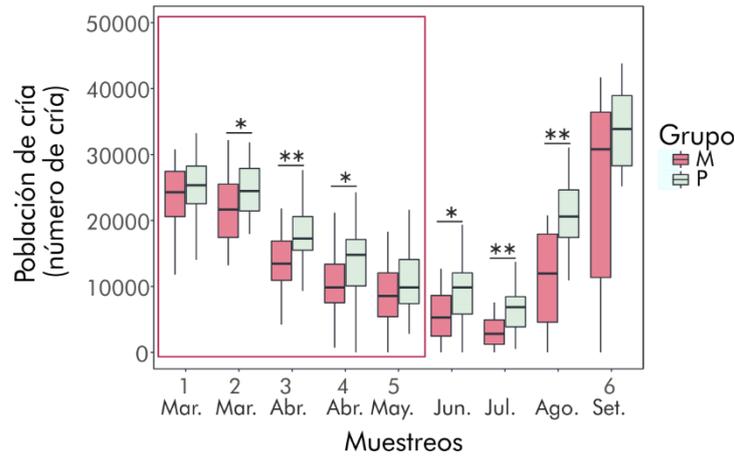


Figura 38. Población de cría durante el período de estrés nutricional y a mediano plazo. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo M y P en los distintos muestreos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). Se resalta con un cuadrado naranja el período de estrés nutricional. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

La calidad de la cría fue compacta durante todo el ensayo en ambos grupos de colmenas. Solamente en el muestreo 2, el 13% de las colonias del grupo M mostraron un nivel de celdas vacías de entre el 10 y 30% de la cría, pero dicho patrón no se mantuvo en el tiempo.

7.4.2.3. Población de abejas adultas y porcentaje de proteína corporal

Al inicio del ensayo todas las colmenas presentaron similar población de abejas adultas (Mann Whitney U Test, $p=0,71$) (Fig. 39; Tabla 9, Apéndice 2). Sin embargo, el estrés nutricional tuvo efectos negativos en este parámetro, ya que las colonias del grupo M presentaron menor población de cría que las colmenas del grupo P (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 39; Tabla 8, Apéndice 2). Dicho efecto fue dependiente del tiempo. Específicamente, la diferencia entre ambos grupos de colmenas fue significativa en los muestreos 2 (Mann Whitney U Test, $p=0,02$), 4 (Mann Whitney U Test, $p=0,004$) y 5 (Mann Whitney U Test, $p=0,02$), mientras que en el muestreo 3 si bien se observa la misma tendencia, la diferencia no es estadísticamente significativa (Mann Whitney U Test, $p=0,34$) (Fig. 39; Tabla 9, Apéndice 2). Los efectos negativos del estrés nutricional

se mantuvieron a mediano plazo, ya que las colonias no suplementadas presentaron menor población de abejas adultas que las suplementadas durante el invierno (Mann Whitney U Test, Junio $p=0,01$; Julio $p=0,001$; Agosto $p=0,02$) y al inicio de la primavera (Mann Whitney U Test, $p=0,02$) (Fig. 39; Tabla 9, Apéndice 2). El tiempo también tuvo un efecto significativo sobre la población de abejas adultas. Dicho efecto fue negativo, por lo que la población de abejas adultas disminuyó entre marzo y mayo (Fig. 39; Tabla 9, Apéndice 2). Se observó un aumento significativo de este parámetro en las colonias de ambos grupos entre agosto y el muestreo 6 (Mann Whitney U Test, $p\leq 0,001$ para los grupos M y P) (Fig. 39; Tabla 9, Apéndice 2). Si bien la estimación del número de abejas adultas se realizó mediante una modificación del método propuesto en el Beebook, los resultados se corresponden con los obtenidos para la población de cría, validando este método.

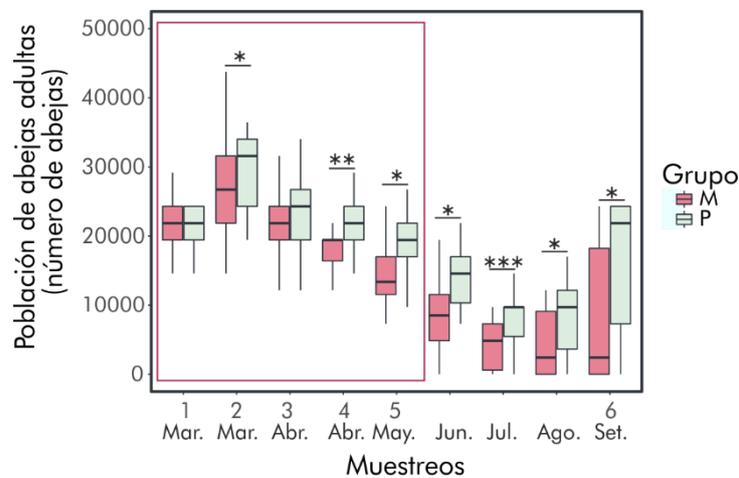


Figura 39. Población de abejas adultas durante el período de estrés nutricional y a mediano plazo. Se muestran únicamente las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo M y P a los distintos muestreos ($*p\leq 0,05$; $**p\leq 0,01$; $***p\leq 0,001$). Se resalta con un cuadrado el período de estrés nutricional. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

Por otro lado, el porcentaje de proteína corporal no se vio afectado por el tratamiento, por el tiempo ni por la interacción entre ambos factores (GLMM, $p \geq 0,05$) (Fig. 40; Tabla 8, Apéndice 2).

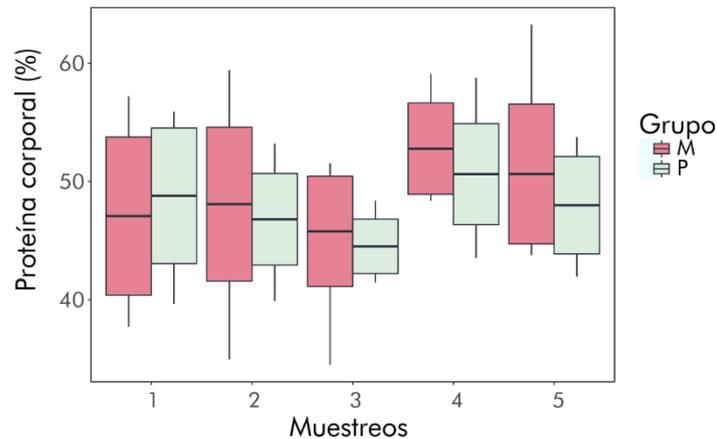


Figura 40. Porcentaje de proteína corporal durante el período de estrés nutricional. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, la media \pm desvío estándar y la media.

7.4.2.4. Reservas y diversidad de polen de las colonias

Las reservas de polen se categorizaron en cinco niveles de acuerdo a la cantidad de caras de panal cubiertas por polen en cada colmena. Dichas reservas fueron similares en ambos grupos de colmenas (χ^2 , $p > 0,05$ entre las colonias del grupo M y P para los cinco niveles establecidos en todos los muestreos).

El estrés nutricional afectó positivamente la diversidad de polen, ya que las colmenas no suplementadas presentaron mayor diversidad de polen que las colmenas suplementadas, siendo dicho efecto marginalmente significativo (GLMM $p = 0,07$) (Fig. 41; Tabla 8, Apéndice 2). En particular, este efecto se observó en los muestreos 3 (Mann Whitney U test, $p \leq 0,001$), 4 (Mann Whitney U test, $p = 0,002$) y 5 (Mann Whitney U test, $p = 0,05$) (Fig. 41; Tabla 9, Apéndice 2). Esta mayor diversidad se dio principalmente por un aumento en la proporción de polen de dos especies de *Baccharis* spp. colectado por las colonias del grupo M (Mann Whitney U test; *Baccharis* spp1.,

Muestreo 3 $p \leq 0,001$, Muestreo 4 $p = 0,01$; *Baccharis* spp2., Muestreo 3 $p = 0,002$, Muestreo 4 $p = 0,01$).

Por otro lado, la diversidad de polen colectado por ambos grupos de colonias se vio afectado negativamente por el tiempo (GLMM, $p \leq 0,05$), por lo que a medida que transcurrió el tiempo la diversidad de polen disminuyó (Fig. 41; Tabla 8, Apéndice 2).

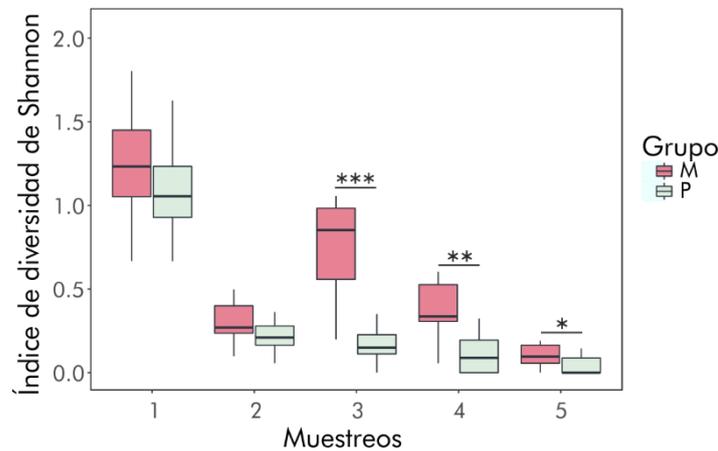


Figura 41. Diversidad de polen según el índice de diversidad de Shannon de las colonias durante el período de estrés nutricional. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo M y P a los distintos muestreos $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$. Las diferencias en cada grupo en el tiempo se detallan en la Tabla 9 del Apéndice 2. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

7.4.2.5. Sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas

Todas las colmenas se mantuvieron en buenas condiciones durante el ensayo, no registrándose síntomas de ninguna enfermedad.

7.4.2.6. Nivel de infección con los patógenos de mayor relevancia apícola

Con el fin de determinar el efecto del estrés nutricional en el estado sanitario de las colonias, se analizó su nivel de infección con *Nosema* sp., los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV, y con el ácaro *V. destructor* en ambos grupos de colonias.

El nivel de infección con *Nosema* sp. se determinó mediante dos métodos: proporción de abejas infectadas y número de esporas en *pool* de abejas analizadas. Ambos métodos mostraron resultados similares. Considerando el primer método de análisis, el nivel de infección con *Nosema* spp. fue bajo y similar en ambos grupos de colmenas al inicio del ensayo. Dichos niveles se vieron afectados positivamente por el estrés nutricional, ya que colmenas sometidas a estrés nutricional presentaron mayor nivel de infección que las colmenas suplementadas con polen (GLMM, $p=0,02$) (Fig. 42; Tabla 8, Apéndice 2). Este efecto del tratamiento fue tiempo dependiente ya que el tratamiento no tuvo efectos por sí mismo en el nivel de infección con este patógeno (GLMM, $p=0,28$) (Fig. 42; Tabla 8, Apéndice 2). En particular, este efecto se observó en los muestreos 4 (Test de t, $p=0,004$) y 5 (Test de t, $p\leq 0,001$) (Fig. 42; Tabla 9, Apéndice 2). Asimismo, los niveles de infección con *Nosema* spp. se vieron afectados positivamente por el tiempo, ya que a medida que transcurrió el mismo los niveles de infección con este microsporidio aumentaron (GLMM, $p\leq 0,05$) (Fig. 42; Tabla 8, Apéndice 2). Al final del período de estrés nutricional todas las colonias estuvieron infectadas con *Nosema* spp. y sus niveles fueron cercanos al 100% (Fig. 42).

La misma tendencia se observó al analizar los niveles de infección en *pool* de abejas, pero las diferencias resultaron estadísticamente significativas en el muestreo 2 (Test de t, $p=0,02$) y 5 (Test de t, $p\leq 0,001$).

A inicios de la primavera los niveles de infección con este microsporidio disminuyeron abruptamente y las diferencias observadas en ambos grupos al final del período de estrés nutricional no se mantuvieron (análisis realizado solamente como proporción de abejas infectadas) (Test de t, $p=0,91$) (Fig. 42).

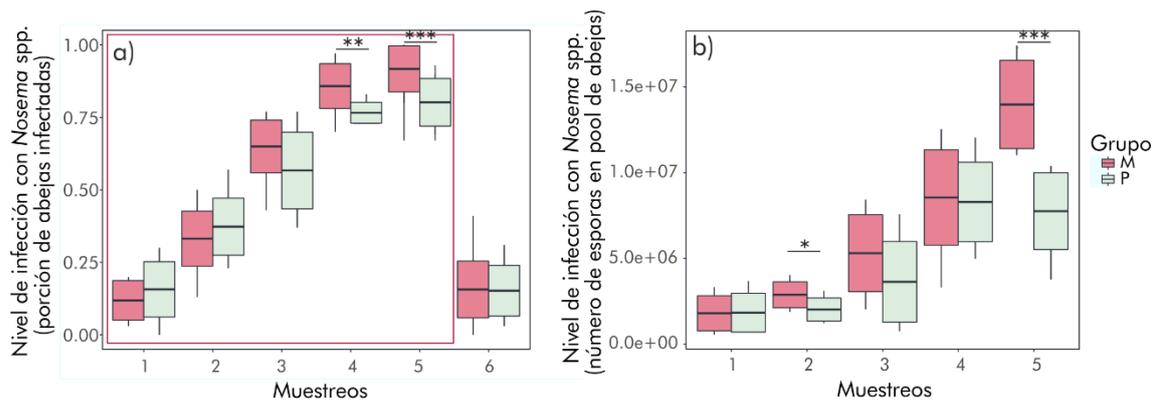


Figura 42. Nivel de infección con *Nosema* spp. de las colonias durante el período de estrés nutricional y a mediano plazo analizado como a) proporción de abejas infectadas, y b) número de esporas en pool de abejas analizadas. Con el objetivo de simplificar la interpretación gráfica, se muestran únicamente las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo M y P a los distintos muestreos * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Las diferencias en cada grupo en el tiempo se detallan en la Tabla 9 del Apéndice 2. Se resalta con un cuadrado el período de estrés nutricional. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, la media \pm desvío estándar y la media.

La/s especies de *Nosema* infectando las colmenas se determinó al inicio del ensayo (muestreo 1), al final del período de estrés nutricional (muestreo 5) y a inicios de la primavera siguiente (muestreo 6). Todas las muestras resultaron positivas para *N. ceranae* a excepción de una colonia del grupo M perteneciente al muestreo 1 la cual mostró co-infección con *N. apis* pero en los muestreos siguientes presentó únicamente *N. ceranae* (Fig. 43).

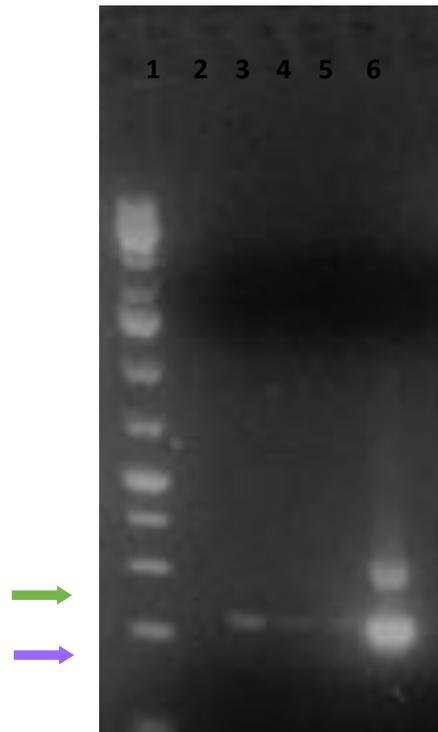


Figura 43. Imagen representativa de gel de agarosa con los productos de amplificación por multiplex PCR del fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* utilizando cebadores específicos para estos microsporidios. El fragmento amplificado para *Nosema ceranae* se estimó en 218pb (flecha lila) y el de *Nosema apis* en 321 pb (flecha verde). Carril 1: marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb Plus, Thermo); Carril 2: control negativo; Carril 3-5: muestras problema; Carril 6: Control positivo *Nosema apis* y *Nosema ceranae*.

Los niveles de infección con virus fueron similares en todas las colonias al inicio del ensayo (Mann Whitney U test, ABPV $p=0,22$; BQCV $p=0.32$; DWV $p=0.23$; SBV $p=0.62$) (Fig. 44; Tabla 7, Apéndice 2). Durante el período de floración del *E. grandis*, los niveles de infección con el ABPV se vieron afectados negativamente por el estrés nutricional, por lo que las colonias del grupo M presentaron significativamente menores títulos virales que las colonias suplementadas (GLMM, $p\leq 0,05$) (Fig. 44; Tabla 8, Apéndice 2). Este efecto fue independiente del tiempo y se observó durante los cuatro muestreos realizados durante el período de floración (Fig. 44; Tabla 9, Apéndice 2). Los niveles de infección con DWV también se vieron afectados negativamente por el estrés nutricional y en particular dicho efecto se observó durante los muestreos 3, 4 y 5 (GLMM, $p\leq 0,05$) (Fig. 44; Tablas 8 y 9, Apéndice 2). Resultados similares se obtuvieron

con el nivel de infección con el SBV (GLMM, $p=0,03$), particularmente en los muestreos 2 y 5 (Fig. 44; Tablas 8 y 9, Apéndice 2). Por otro lado, los niveles de infección con el BQCV no se vieron afectados por el estrés nutricional (GLMM, $p\geq 0,05$) (Tabla 8, Apéndice 2). Esto se debe a que los niveles de infección con este virus variaron en los distintos muestreos siendo mayor en las colonias del grupo P con respecto al grupo M en el muestreo 3 (Mann Whitney U test, $p\leq 0,001$) y menor en el muestreo 4 (Mann Whitney U test, $p=0,01$), mientras que no se observaron diferencias entre ambos grupos en los restantes muestreos (Mann Whitney U Test; muestreo 2 $p=0,9$, muestreo 5 $p=0,1$) (Fig. 44; Tabla 9, Apéndice 2). El estrés nutricional no tuvo efecto a mediano plazo, ya que ambos grupos de colmenas presentaron similares niveles de infección con el ABPV, BQCV, DWV y SBV en primavera (Mann Whitney U test, ABPV $p=0,90$, BQCV $p=0,41$, DWV $p=0,80$, SBV $p=0,26$) (Fig. 44; Tabla 9, Apéndice 2).

Los niveles de infección con el ABPV y DWV se vieron afectados negativamente por el tiempo, por lo que a medida que transcurrieron los muestreos, los niveles de infección con estos virus disminuyeron (Fig. 44; Tabla 9, Apéndice 2). Por otro lado, los niveles del BQCV y SBV no se vieron afectados por el transcurso del tiempo (Fig. 44; Tabla 9, Apéndice 2).

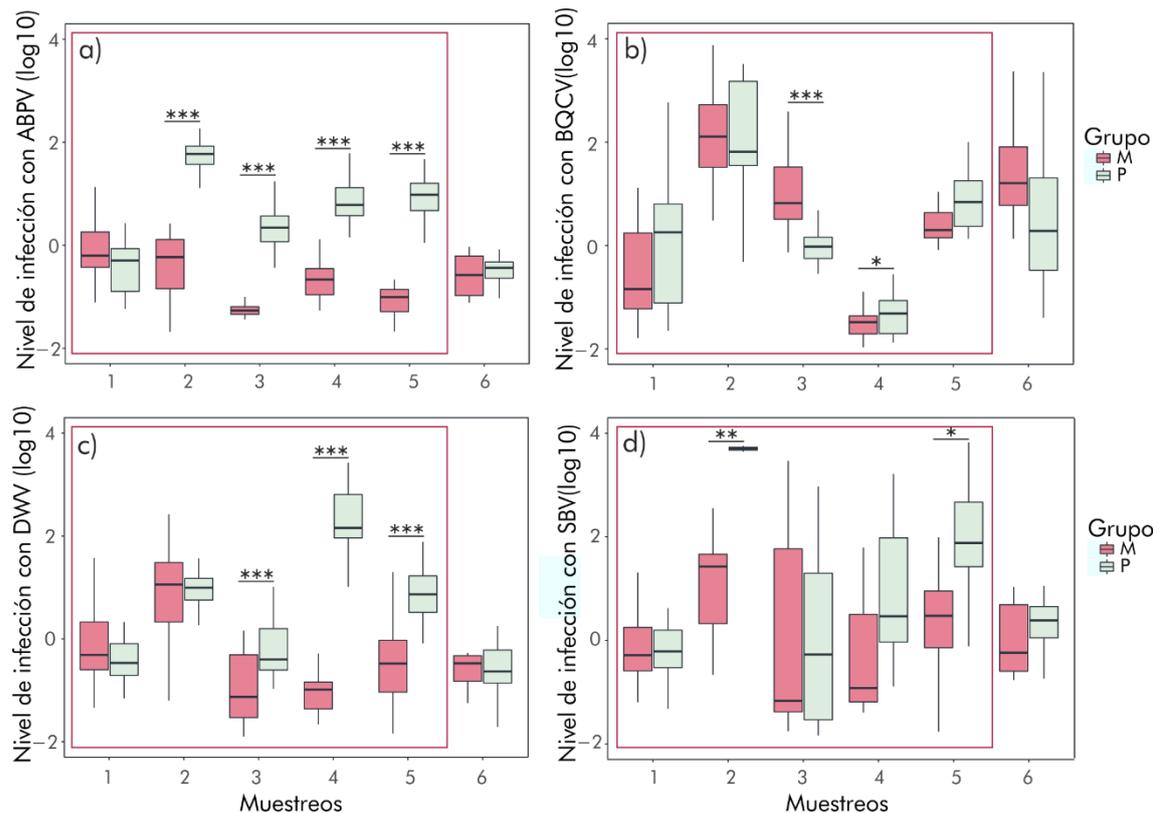


Figura 44. Nivel de infección con los virus ABPV (a), BQCV (b), DWV (c) y SBV (d) de las colonias durante el período de estrés nutricional y a mediano plazo. Con el objetivo de simplificar la interpretación gráfica, se muestran únicamente las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo M y P en los distintos muestreos * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Las diferencias en cada grupo en el tiempo se detallan en la Tabla 9 del Apéndice 2. Se resalta con un cuadrado naranja el período de estrés nutricional. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

Por otro lado, los niveles de infestación con *V. destructor* se vieron afectados positivamente por el estrés nutricional, siendo dicho efecto dependiente del tiempo (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 45; Tabla 8, Apéndice 2). Por otro lado, el tiempo tuvo un efecto positivo en el nivel de infestación con este ácaro ya que a medida que transcurrieron los muestreos, los niveles aumentaron (GLMM, $p \leq 0,05$) (Fig. 45; Tabla 8, Apéndice 2). Estos análisis se realizaron únicamente considerando la proporción de abejas infectadas pero la misma tendencia se observa considerando el total de ácaros foréticos por colmena (Fig. 45).

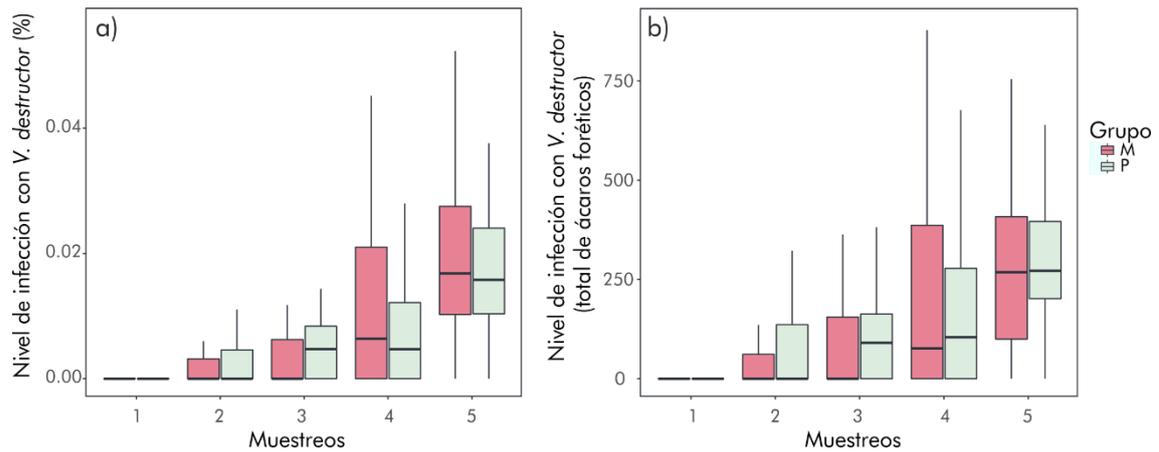


Figura 45. Nivel de infectación con *Varroa destructor* representado como a) la proporción de abejas infectadas y como b) el total de ácaros foréticos de las colonias durante el período de estrés nutricional y a mediano plazo. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

7.4.2.7. Producción de miel

Al final del período de floración del *E. grandis* se estimó la producción de miel por colmena. Ambos grupos de colmenas presentaron similar producción de miel (Test de t, $p=0,64$) (Fig. 46).

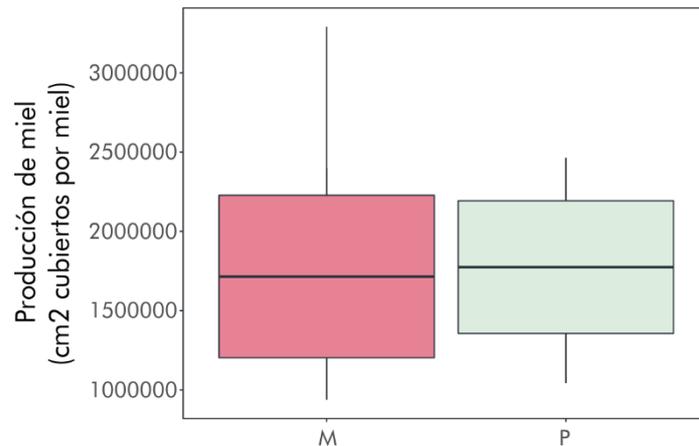


Figura 46. Producción de miel por colmena. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, la media \pm desvío estándar y la media.

7.4.2.8. Asociación entre los niveles de infección con *Nosema* spp. y la población de abejas adultas

Se analizó la variación de la población de abejas adultas en función del tratamiento y de los niveles de infección con *Nosema* spp. La población de abejas adultas se vio afectada negativamente por los niveles de infección con este microsporidio (GLMM, $p \leq 0,05$) (Tabla 8, Apéndice 2). Dicho efecto se observó además en interacción con el tratamiento, observándose un efecto negativo entre el estrés nutricional y los niveles de infección con *Nosema* spp. en la población de abejas (GLMM, $p \leq 0,05$) (Tabla 8, Apéndice 2).

7.4.2.9. Pérdidas de colonias

Durante el período de estrés nutricional se perdieron el 7% de las colonias del grupo M y el 10% de las del grupo P, no habiendo diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de las colonias entre ambos grupos (Test de proporciones, $p=0,66$). Durante el invierno, el 40% de las colonias del grupo M se perdieron, mientras que en el grupo P se perdieron el 18% de las colonias. Sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Test de proporciones, $p=0,13$).

7.4.3. Ensayo 2: Impacto de la suplementación invernal con polen en colonias que estuvieron sometidas a estrés nutricional.

El objetivo de este ensayo fue evaluar una posible estrategia para revertir los efectos del estrés nutricional luego de pasar por dicho estrés. Para esto, colmenas que estuvieron en una plantación de *E. grandis* durante su período de floración se trasladaron a INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay) y se dividieron en dos grupos (MM y MP). Las colonias del grupo MP recibieron suplementación con polen polifloral mensualmente durante el invierno.

7.4.3.1. Cantidad y calidad de cría

La población de cría no se vio afectada por el tratamiento ni por la combinación de éste y el tiempo (Fig. 47; Tabla 10, Apéndice 2). Sin embargo, al realizar las comparaciones pareadas se observó que las colmenas del grupo MP presentaron mayor población de cría que las del grupo MM durante los meses de junio y agosto (Fig. 47; Tabla 11, Apéndice 2). El tiempo afectó positivamente la cantidad de cría de las colonias, ya que dicha variable aumentó significativamente hacia setiembre (primavera) en ambos grupos de colonias (Fig. 47; Tabla 11, Apéndice 2).

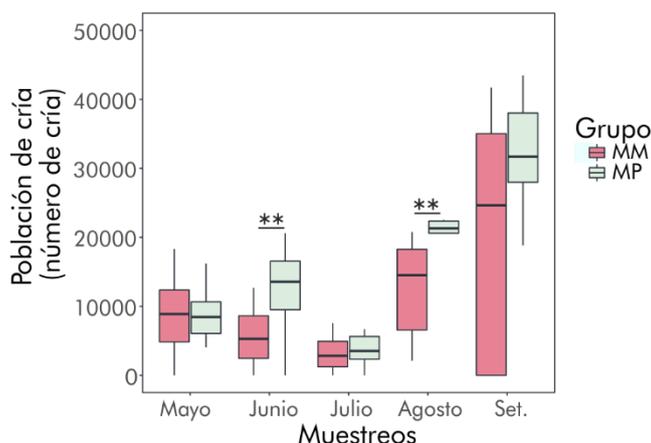


Figura 47. Población de cría de las colonias de los grupos MM y MP luego del período de estrés nutricional. Con el objetivo de simplificar la interpretación gráfica, se muestran únicamente las diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a los distintos muestreos ($*p \leq 0,05$). Las diferencias en cada grupo en el tiempo se detallan en la Tabla 9 del Apéndice 2.

Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana.

La calidad de la cría de las colonias del grupo MP fue compacta durante todo el ensayo. Las colonias del grupo MM también presentaron en su mayoría cría compacta a excepción de los meses de julio, agosto y setiembre, en los cuales el 23%, 15% y 22% de las colonias, respectivamente presentaron cría salteada. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Chi2: julio, cría salteada $p=0,31$; agosto, cría salteada $p=0,58$; setiembre cría salteada $p=0,45$).

7.4.3.2. Población de abejas adultas

Luego del período de floración de *E. grandis*, la población de abejas adultas no se vio afectada por la suplementación (Tabla 10, Apéndice 2). Sin embargo, al comparar ambos grupos de colmenas en los distintos muestreos es posible observar mayor población de abejas en el muestreo de julio y de setiembre, con un valor estadístico marginal (Fig. 48; Tabla 11, Apéndice 2). La población de abejas tampoco se vio afectada por el tiempo (Tabla 10, Apéndice 2).

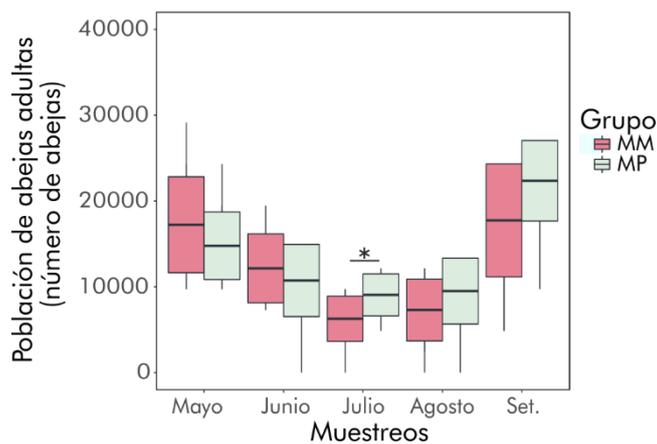


Figura 48. Población de abejas adultas de las colonias de los grupos MM y MP luego del período de estrés nutricional. Con el objetivo de simplificar la interpretación gráfica, se muestran únicamente las diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a los distintos muestreos ($*p \leq 0,05$). Las diferencias en cada grupo en el tiempo se detallan en la Tabla 11 del Apéndice 2. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, la media \pm desvío estándar y la media.

7.4.3.3. Reservas de polen

Las reservas de polen fueron similares en ambos grupos de colmenas (Test de Chi², $p > 0,05$ entre las colonias del grupo MM y MP para los cinco niveles establecidos en todos los muestreos).

7.4.3.4. Sintomatología de las enfermedades más comunes que afectan a las abejas

No se registró la aparición de síntomas característicos de las distintas patologías analizadas durante el transcurso del ensayo (loque americana, loque europea, cría yesificada, opérculo irregular o canibalismo).

7.4.3.5. Nivel de infección con los patógenos de mayor relevancia apícola

Luego del período de estrés nutricional prácticamente el 100% de las abejas analizadas presentaron esporas de *Nosema* sp, con similares niveles de infección por este microsporidio en ambos grupos de colmenas (Fig. 49; Test de t, $p=0,12$). Dichos niveles disminuyeron significativamente en setiembre (primavera) Test de t: MM $p\leq 0,001$; MP $p\leq 0,001$), no mostrando diferencias entre ambos grupos de colmenas (Fig. 49) (Test de t, $p=0,10$).

Todas las colonias estuvieron infectadas con *N. ceranae* a excepción de una sola muestra del grupo MM que presentó co-infección con *N. apis* en el muestreo 6 (resultados no mostrados).

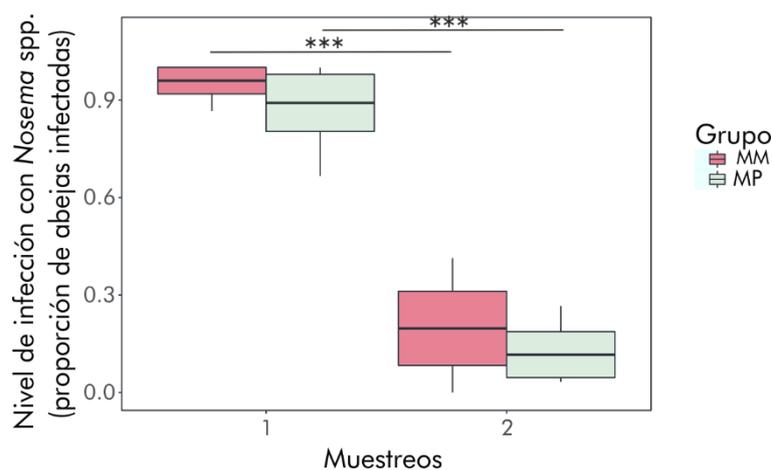


Figura 49. Nivel de infección con *Nosema* spp. de las colonias de los grupos MM y MP luego del período de estrés nutricional. * $p\leq 0,05$; ** $p\leq 0,01$; *** $p\leq 0,001$. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, la media \pm desvío estándar y la media.

La suplementación durante el invierno tampoco modificó los niveles de infección con los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV ya que ambos grupos de colmenas presentaron similares niveles de infección con estos virus en primavera (Mayo: Test de t, ABPV $p=0,29$, BQCV $p=0,98$; Test de t: DWV $p=0,34$, SBV $p=0,13$; Setiembre: Test de t, ABPV $p=0,9$, BQCV $p=0,96$; Test de t: DWV $p=0,61$, SBV $p=0,77$) (Fig. 50). Dichos niveles se mantuvieron constantes desde mayo a setiembre para todos los virus a excepción del ABPV el cual aumentó en el tiempo (Test de t: ABPV MM $p=0,002$, MP $p=0,003$, BQCV MM $p=0,07$, MP $p=0,35$; Test de t: DWV MM $p=0,81$, MP $p=0,55$, SBV MM $p=0,16$, MP $p=0,91$) (Fig. 50).

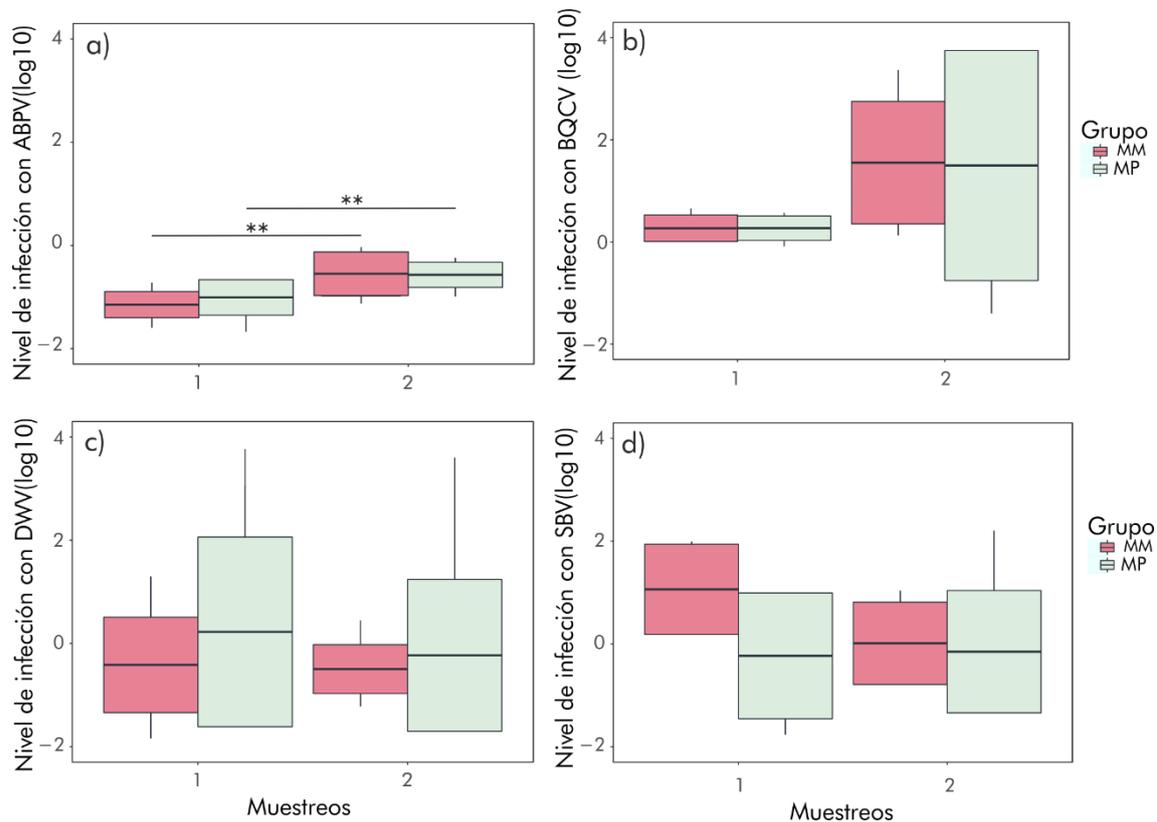


Figura 50. Nivel de infección con los virus a) ABPV, b) BQCV, c) DWV y d) SBV de las colonias de los grupos MM y MP luego del período de estrés nutricional. $**p \leq 0,01$. Los *boxplots* indican los datos mínimos, máximos, la media \pm desvío estándar y la media.

7.4.3.6. Pérdida de las colonias

Luego del invierno se perdió el 16,6% de las colonias en ambos grupos experimentales, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Test de proporciones, $p=0,99$).

7.5- Discusión

El fenómeno de pérdidas de colonias de abejas melíferas reportado en los últimos años ha sido un tema de preocupación mundial, tanto para la comunidad científica como para la sociedad en general (Kaplan, 2008; Carreck & Neumann, 2010; Potts *et al.*, 2010b, 2016; Gray *et al.*, 2019). Este capítulo se focalizó en el estudio de dos de las principales causas asociadas a dicho fenómeno: el estrés nutricional y la infección con plagas y patógenos, utilizando como ambiente modelo de estrés nutricional las plantaciones de *E. grandis*. En el primer ensayo de este capítulo se evaluó el efecto del estrés nutricional en la fortaleza, salud y productividad de colonias ubicadas en dichos ambientes durante el período de estrés y a mediano plazo. Para esto, se utilizaron colonias ubicadas en una plantación de *E. grandis* y, con el objetivo mitigar dicho estrés, se suplementó a un grupo de colonias con tortas de polen polifloral.

El estudio de la diversidad de polen y calidad nutricional de la torta de polen polifloral y el polen colectado por las abejas (PA) permitió comprobar que ambos grupos de colonias tenían a su disposición alimentos diferentes. La torta de polen polifloral permitió que las colonias suplementadas tuvieran a su disposición polen de diverso origen botánico. Teniendo en cuenta que los distintos pólenes poseen diferente composición de aminoácidos, lípidos, vitaminas y minerales (Somerville, 2001), la mayor diversidad de polen podría aumentar las probabilidades de suplir a las abejas con los requerimientos nutricionales necesarios. Esta mayor disponibilidad de recursos nutricionales fue comprobada, ya que el polen polifloral de la torta presentó una mayor proporción de los aminoácidos esenciales para las abejas y un mayor contenido de lípidos que el PA. En contraste, el PA consistió principalmente en polen de *E. grandis*. Su porcentaje de proteína cruda disminuyó a lo largo del período de floración de estos árboles, coincidiendo con los resultados obtenidos por Invernizzi y colaboradores (2011). Dicha disminución podría deberse principalmente a variaciones de temperatura ambiental (Herbert, 1992), factor que varía sensiblemente en esa época del año y en la zona donde se ubican estas plantaciones. Además, dicho porcentaje de proteínas fue inferior al ofrecido a las abejas en la torta de polen polifloral, y no alcanzó en algunos muestreos el mínimo porcentaje de proteínas requerido (20%) para el mantenimiento de la colonia. Asimismo, el porcentaje de lípidos ofrecido en la torta de polen polifloral fue muy superior al disponible en el PA. Si bien no existe información vinculada a los requerimientos de lípidos mínimos para las abejas, el porcentaje de estos compuestos

disponible en el PA fue similar al de las especies de polen con menor contenido de lípidos descriptas (Roulston & Cane, 2000; Manning, 2001b; Somerville, 2001). La cantidad de proteínas y lípidos ingeridos se asocia con la edad de inicio de pecoreo de las abejas, ya que una menor proporción de estos compuestos acelera la transición de abeja nodriza a pecoreadora (Toth, 2005; Nilsen *et al.*, 2011). Además, el polen de *Eucalyptus* spp. se encuentra dentro de los pólenes con mayor relación de omega 6-3 (Arien *et al.*, 2015) y las deficiencias de omega 3 se han asociado a enfermedades y desórdenes neurológicos (Brenna, 2011; Watson & Meester, 2014). Todo esto confirma que si bien todas las colonias se encontraban en un ambiente cuyo polen disponible fue nutricionalmente pobre, las colonias suplementadas con polen polifloral tuvieron acceso a polen de mejor valor nutricional.

Un aspecto interesante fue la calidad nutricional del polen de *E. grandis* (PE) ya que su porcentaje de proteínas, lípidos y la proporción de aminoácidos fue superior al del PA. Esto sugiere que a pesar de que el polen acompañante al del *E. grandis* presente en la muestra de PA se encontraba en baja proporción, éste fue aún peor desde el punto de vista nutricional y consecuentemente diluyó los valores nutricionales de la mezcla de pólenes que entraba a las colmenas. Este aspecto es importante considerando que las colonias sin suplementar tendieron a coleccionar mayor diversidad de polen que las colonias del grupo suplementadas y por lo tanto la calidad nutricional del polen que ingresó a las colonias del primer grupo fue aún peor que el que ingresó a las colonias del segundo. La diferencia en la diversidad de polen coleccionado por ambos grupos de colmenas podría ser una consecuencia de la suplementación con polen administrada, ya que se ha reportado que colonias bajo estrés nutricional aumentan su actividad de pecoreo (Fewell & Winston, 1992; Dreller *et al.*, 1999) y como se mencionó previamente, el bajo contenido de proteínas y lípidos acelera la transición de comportamiento de las abejas. En este estudio, ambos grupos de colmenas presentaron similares reservas de polen. Este resultado podría deberse a que las abejas de las colonias sin suplementar efectivamente coleccionaron más polen pero también consumieron más, o a que simplemente el método utilizado para estimar la cantidad de polen de las colonias (en categorías) no fue lo suficientemente sensible. Probablemente, la estimación como porcentaje de cuadro cubierto por polen sea un estimador más certero de dicha variable. La diferencia de diversidad de polen y su consecuente contenido nutricional permiten proponer que una vez que las colonias son sometidas a estrés nutricional, i) se

da un aumento de actividad de pecoreo con el consecuente mayor ingreso de polen diverso. Si este estrés nutricional se da en otoño, momento en que la calidad nutricional del polen decrece (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2018), posiblemente disminuya aún más la calidad del polen que ingresa, y por lo tanto el estrés nutricional sería aún mayor.

El porcentaje de proteína corporal de las abejas se utilizó como indicador del estado nutricional de las mismas. Sin embargo, si bien ambos grupos de colmenas tuvieron a su disposición pólenes nutricionalmente diferentes, no fue posible observar diferencias en el porcentaje de proteína corporal entre ambos grupos, tal como se reportó en estudios previos (Invernizzi *et al.*, 2011a). Esto podría deberse a que el análisis se realizó sobre abejas nodrizas muestreadas sobre el nido de cría, por lo que las abejas muestreadas varían en edad. Teniendo en cuenta las variaciones en el consumo de polen en las abejas durante su primera etapa de vida (Crailsheim *et al.*, 1992), la ausencia de diferencias podría deberse a la enorme variación de este parámetro durante esta etapa. Posiblemente, el análisis de proteína corporal en abejas de la misma edad sea un indicador más certero, aunque su abordaje a nivel de campo y con el número de colmenas utilizadas en este ensayo sea difícilmente realizable. Por otro lado, el hecho que el porcentaje de proteína corporal aumente en el tiempo a pesar de que el contenido de proteínas del polen disponible en el ambiente disminuya, sugiere que ambas variables no se encuentran directamente relacionadas.

El estrés nutricional afectó la fortaleza de las colonias y los niveles de infección con *N. ceranae*. A nivel de la fortaleza de las colonias, dicho estrés nutricional disminuyó la población de las abejas adultas. Este efecto fue dependiente del tiempo, por lo que es posible plantear que, si el estrés nutricional se da por períodos más prolongados, las consecuencias podrían incrementarse. Este efecto podría estar asociado a que las abejas y cría de colmenas mejor nutridas tienen mayor expectativa de vida, posiblemente porque esa mejor nutrición les confiere la capacidad de defenderse mejor frente a la infección con patógenos (Alaux *et al.*, 2010; DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015). En estudios previos en los cuales se suplementaron colmenas bajo estrés nutricional, no observó un efecto de dicho estrés en la población de abejas y cría (Invernizzi *et al.*, 2011a; Mortensen *et al.*, 2018). Las diferencias entre estos trabajos podrían deberse a las dietas utilizadas para suplementar las colonias, a la magnitud del estrés nutricional en que las colonias estaban sometidas, o a ambos factores en combinación. En el tiempo, la

población de las colmenas tuvo el mismo comportamiento en ambos grupos, siguiendo su dinámica normal en esta época del año: disminución hacia los meses más fríos del año y aumento con el comienzo de la primavera. Un aspecto interesante es que este aumento hacia la primavera fue más significativo en las colonias suplementadas en comparación a las del grupo sin suplementar. Esto sugiere que una vez que las colonias sufren estrés nutricional, no logran recuperarse cuando las condiciones ambientales son favorables, así como lo harían colonias que no sufrieron tal estrés.

En cuanto a los efectos del estrés nutricional en el estado sanitario de las colmenas, fue posible observar que dicho estrés afectó positivamente los niveles de infección con *Nosema* sp., siendo dicho efecto tiempo-dependiente. Invernizzi y colaboradores (2011) reportaron que colonias ubicadas en plantaciones de *E. grandis* y con reservas de polen o reservas y suplementación de polen, presentaron menores niveles de infección con este microsporidio que colonias sin reservas ni suplementación. Dichos autores atribuyeron estas diferencias a la disponibilidad de polen diverso, y no a la cantidad de polen de las colonias. Esto se debe a que las colonias ubicadas en estos ambientes tienen un exceso de polen logrando “bloquear” significativamente el área de cría. Esta hipótesis podría aplicarse también a los resultados obtenidos en esta tesis. Una diferencia importante entre ambos trabajos es la relación entre el estrés nutricional, la población de abejas y cría, y los niveles de infección con *Nosema* spp. Invernizzi y colaboradores (2011) no observaron un efecto del estrés nutricional en la población de cría de las colonias, mientras que en este ensayo no solo las colonias bajo estrés nutricional presentaron menor población de abejas y cría, sino que la población de abejas se asoció negativamente con los niveles de infección con *Nosema* spp. principalmente en colonias sometidas a estrés nutricional. Estos resultados indican un claro efecto del estrés nutricional y estado sanitario en la fortaleza de las colonias. La falta de dicha observación por parte de Invernizzi y colaboradores podría deberse a que la cantidad de polen utilizado para mitigar los efectos del estrés nutricional no fue suficiente. Estudios previos y los resultados obtenidos en el capítulo 1 de esta tesis han demostrado que, bajo condiciones de laboratorio, abejas alimentadas con polen presentan mayor nivel de infección con *Nosema* spp. pero sobreviven más que las privadas del consumo de polen (Porrini *et al.*, 2011; Basualdo *et al.*, 2014b; Jack *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que un aumento de los recursos nutricionales promueve la replicación de *Nosema* spp., pero los efectos benéficos de la nutrición en la fisiología de las abejas

compensan los efectos negativos de la infección. Esta discrepancia entre estudios de laboratorio y de campo puede asociarse a distintos factores. Por un lado, los mecanismos de inmunidad social necesarios para la reducción de la dispersión de *N. ceranae* (Biganski *et al.*, 2018) no puedan ser puestos en marcha a nivel de laboratorio. Por otro lado, dicha discrepancia podría asociarse también a la relación entre los cambios fisiológicos de las abejas regulados por la nutrición y la consecuente transición comportamental. En ensayos a nivel de laboratorio, la fisiología de las abejas cambia en asociación a la nutrición (Bomtorin *et al.*, 2014; Guidugli *et al.*, 2005; capítulo 1 de esta tesis) pero no experimentan la transición de comportamiento (porque las condiciones experimentales no lo permiten). De esta forma, abejas alimentadas con distintas dietas y muestreadas a tiempos específicos se encuentran en distintos estados nutricionales y fisiológicos. Sin embargo, cuando a nivel de campo las abejas comienzan a realizar actividades de pecoreo, sus reservas nutricionales disminuyen notablemente, así como su fisiología (Toth & Robinson, 2005; Corona *et al.*, 2007). En este sentido, Ament y colaboradores propusieron que la maduración comportamental se encuentra bajo control nutricional (Ament *et al.*, 2008b) y que los cambios de maduración de la fisiología de las abejas se asocian con el comportamiento y no con su edad (Ament *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que la nutrición afecta el sistema inmune (Alaux *et al.*, 2010), es esperable que cuando las abejas comienzan las actividades de pecoreo, la magnitud de su respuesta inmune se relacione con la cantidad de polen consumido durante su etapa de nodriza o con la mínima cantidad de jalea real que consume durante su etapa de pecoreadora (Camazine *et al.*, 1998; Crailsheim, 1998). Por lo tanto, abejas pecoreadoras de colmenas bajo estrés nutricional no son capaces de montar una respuesta inmune contra *Nosema* spp. tan eficiente como la montada por las pecoreadoras provenientes de colonias suplementadas. Este efecto en la respuesta inmune de las abejas podría ser una consecuencia directa del polen en la fisiología de las abejas (Alaux *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013) o podría darse debido a que este polen contribuya al establecimiento de la microbiota intestinal, la cual poseen funciones inmunomoduladoras (Engel & Moran, 2013b; Powell *et al.*, 2014; Kwong *et al.*, 2017). Por último, el hecho que *N. ceranae* fue el microsporidio predominante infectando las colonias durante el ensayo coincide con estudios previos (Invernizzi *et al.*, 2009; Antúnez *et al.*, 2015; Anido *et al.*, 2016). De esta forma, el efecto del estrés nutricional en la fortaleza de las colonias y nivel de infección con *Nosema* spp., puede especificarse a *N. ceranae* en particular.

En cuanto al efecto del estrés nutricional en los niveles de infección con virus, los resultados no fueron los esperados, ya que se ha propuesto que abejas alimentadas con polen tienen la capacidad de disminuir la replicación viral en comparación a abejas desnutridas (DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Alaux y colaboradores (2011a). Estos autores encontraron que abejas alimentadas con polen en el laboratorio, presentaban mayor nivel de infección con el DWV que las alimentadas con jarabe y sugirieron que una mayor maquinaria celular disponible en abejas alimentadas con polen podría contribuir a un mayor desarrollo de las poblaciones virales pero también favorecer a las abejas a resistir los efectos de las infecciones virales. Teniendo en cuenta que los virus son patógenos intracelulares obligados cuya replicación depende de la célula hospedera, la misma explicación podría aplicarse a los restantes virus analizados. Por otro lado, los resultados obtenidos son consistentes con que (al menos) el DWV podría competir con *N. ceranae* por recursos nutricionales y el microsporidio sería más eficiente en dicha competencia (Costa *et al.*, 2011; Doublet *et al.*, 2015; Tritschler *et al.*, 2017), ya que las colonias bajo estrés nutricional fueron las que presentaron menor nivel de infección con virus pero mayor nivel de infección con *N. ceranae*, inversamente a las colonias suplementadas. Más allá de las razones por las cuales los niveles de infección con virus fueron superiores en colonias suplementadas en comparación a las que se encontraban bajo estrés nutricional, el hecho que las colonias suplementadas presentaran mayor población de abejas adultas y cría permiten concluir que estos niveles de infección no tuvieron un efecto en la fortaleza de las colonias. La comparación entre los niveles de virus obtenidos en este ensayo y los que suelen tener colmenas del hemisferio norte (información suministrada por el Dr. Miguel Corona) permite proponer que posiblemente los niveles encontrados no sean los suficientes para superar un umbral de daño. El hecho de que los niveles del ABPV, BQCV y DWV hayan disminuido con el tiempo, sugiere que la dinámica de estos virus podría asociarse de forma indirecta a variables ambientales, no sucediendo lo mismo con el SBV (Beaurepaire *et al.*, 2020).

Por último, los niveles de infestación con *V. destructor* fueron mayores en colonias sometidas a estrés nutricional y aumentaron en el tiempo. Estos resultados permiten proponer que posiblemente dicho efecto se deba a que las abejas de las colonias con déficit nutricional no pueden expresar eficientemente una resistencia comportamental (comportamiento higiénico y *grooming*) frente al ácaro, de forma de mantener bajos los

niveles de infestación (Rosenkranz *et al.*, 2010). Por otro lado, a pesar de que las colonias bajo estrés nutricional presentaron mayor nivel de infestación con *V. destructor*, simultáneamente presentaron menor nivel de infección con virus, por lo que es posible disociar ambas variables y asociarlas directamente al estrés nutricional.

Si bien las colonias que recibieron suplementación con polen presentaron mayor población de abejas adultas, este efecto no se vio reflejado a nivel productivo ya que la producción de miel fue similar en ambos grupos de colmenas. Este resultado no fue esperado ya que una se supone que colmenas con mayor cantidad de abejas tienen mayor potencial productivo. Sin embargo, debido a que la suplementación se comenzó a realizar durante el período de estrés nutricional, es posible que el efecto de dicha suplementación sea significativo a nivel de la cría que es alimentada con este polen. En ese caso, las abejas que recibieron el polen proveniente de la torta durante su etapa de cría salieron a pecorear como mínimo al mes de haberse instalado las colmenas en la plantación, momento en el cual el pico de oferta nectarífera ya había disminuido. También es posible que, si bien se observó un efecto de la suplementación con polen en la población de abejas, esta mayor cantidad de abejas no fue suficiente como para observar diferencias en la producción de miel. Teniendo en cuenta ambas hipótesis, se requieren más estudios para determinar si la suplementación con polen polifloral es una herramienta que permita mejorar la producción de miel en las forestaciones de *E. grandis*.

Por último, si bien no hubo diferencia de pérdidas de colmenas entre ambos grupos, el hecho que mueran el doble de colmenas sometidas a estrés nutricional durante el invierno puede significar una gran pérdida a nivel de una apicultura comercial. Además, es importante resaltar que la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en relación con este parámetro puede deberse a que las colmenas se reubicaron en una región más favorable desde el punto de vista ambiental. Por lo tanto, no es posible descartar que en caso de que las colmenas se mantengan en las plantaciones de *E. grandis*, el estrés nutricional impacte fuertemente en la mortalidad de las colonias (Invernizzi *et al.*, 2020). El efecto positivo de la reubicación de las colonias en un ambiente más favorable también podría haber sido el motivo por el cual no se observó un efecto del estrés nutricional en los niveles de infección con *N. ceranae* y virus ARN a mediano plazo.

El objetivo de la segunda parte de este capítulo fue evaluar los efectos de la suplementación con polen polifloral durante el invierno en colmenas que estuvieron sometidas a estrés nutricional en otoño. Para esto, una vez que las colmenas que estuvieron en una plantación de *E. grandis* fueron reubicadas en un ambiente más favorable, se dividieron en dos grupos y uno de ellos recibió la suplementación con polen polifloral mensualmente, mientras que el otro solo utilizó los recursos poliníferos del entorno. Debido a registros históricos, la cantidad y diversidad del polen disponible en estos ambientes durante el invierno es baja (Antúnez *et al.*, 2015) y, por lo tanto, era esperable que bajo estas circunstancias la suplementación con polen mejoraría la fortaleza y salud de las colonias. Sin embargo, la suplementación con polen afectó positivamente a la población de cría y abejas adultas únicamente en períodos específicos, no teniendo un efecto claro ni mantenido en el tiempo. Dicha suplementación tampoco tuvo efectos en los niveles de infección con los distintos patógenos analizados ni en las pérdidas de colonias. El hecho que la suplementación haya afectado la fortaleza de las colonias principalmente en los meses más fríos del año sugiere que cuando las condiciones ambientales son favorables, la suplementación no tiene efectos. Esto puede deberse a que i) las consecuencias del estrés nutricional son muy difíciles de mitigar, logrando un efecto del tratamiento propuesto únicamente bajo condiciones ambientales muy adversas, pero que dichos efectos no se mantienen en el tiempo, o ii) que la cantidad y diversidad de polen administrado no fue suficiente para cubrir las necesidades coloniales en esos meses y en ese lugar. Estudios previos han planteado resultados contrastantes en cuanto al efecto de la suplementación proteica en la población de abejas, dependiendo de la época del año en que se realizaron los experimentos y las condiciones ambientales e ingreso de polen que tenían las colonias (Mattila & Otis, 2006; DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2016).

En cuanto al efecto de la suplementación polínica en los niveles de infección con *Nosema* spp., como se mencionó anteriormente se han reportado resultados contrastantes tanto a nivel de campo como de laboratorio. DeGrandi-Hoffman y colaboradores (2016) reportaron un efecto negativo de la suplementación proteica en los niveles de infección con este patógeno durante otoño e invierno, mientras que a nivel de laboratorio se ha reportado que distintas dietas y suplementos polínicos afectan diferente los niveles de *Nosema* sp. (Fleming *et al.*, 2015). Estos resultados contrastantes reflejan que las distintas condiciones ambientales afectan diferencialmente el desarrollo

de *Nosema* spp. Bajo las condiciones de este ensayo, la suplementación con polen durante el invierno no afectó los niveles de *Nosema* sp. Alternativamente, es posible que el eventual efecto positivo de la suplementación en la infección con este microsporidio se haya visto enmascarado por la cantidad y diversidad de polen disponible en la primavera o que la cantidad de polen administrada a las colonias no haya sido suficiente para afectar los niveles de *Nosema* spp. Estas hipótesis podrían explicar también la falta de efecto de la suplementación con polen en los niveles de virus analizados.

Por otro lado, la disminución significativa de los niveles de *Nosema* spp. a valores cercanos a cero en primavera y el aumento significativo del ABPV en este período de tiempo en ambos grupos de colonias sugiere que los factores ambientales y posiblemente la dinámica colonial influyeron en gran medida la dinámica de infección de estos patógenos (Beaurepaire et al., 2020).

En suma, los dos estudios realizados a nivel de campo muestran que los recursos poliníferos que disponen las colmenas tienen consecuencias a nivel poblacional y sanitario, aunque la magnitud del efecto varía según las condiciones ambientales.

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten comprobar la hipótesis planteada: el estrés nutricional impacta la fortaleza, estado sanitario, productividad y supervivencia de las colonias a corto y mediano plazo. Dichos efectos no pueden ser mitigados luego de transcurrido el período de estrés nutricional.

8. CONSIDERACIONES FINALES

Como una aproximación a la comprensión de los efectos del estrés nutricional en las abejas melíferas, en esta tesis se abordó en una primera instancia el efecto del estrés nutricional y de su interacción con la infección con *N. ceranae*, en la supervivencia diaria de las abejas, en diferentes parámetros fisiológicos y en los niveles de infección natural con el DWV. En una segunda instancia, se analizó el efecto de la microbiota intestinal y las interacciones con abejas nodrizas en la asimilación y procesamiento de esas dietas. Teniendo en cuenta que los estudios de cría de abejas en condiciones controladas son muy útiles para disgregar el efecto de distintas variables, pero limitados en cuanto a su extrapolación a la naturaleza, en el capítulo 3 de esta tesis se evaluó a nivel de campo primeramente el efecto del estrés nutricional en la fortaleza y salud de las colonias y posteriormente, el efecto de la suplementación con polen en invierno, como medida para mitigar los efectos negativos asociados al estrés nutricional. La utilización de polen monofloral de *E. grandis* en los ensayos en condiciones controladas y la ubicación de las colonias en montes de estos árboles permiten asociar los resultados obtenidos a partir de los distintos abordajes metodológicos.

En todos los ensayos realizados en condiciones controladas de laboratorio se evidenció la importancia de la alimentación con polen para aumentar la supervivencia de las abejas. Esto demuestra que en aquellas condiciones en las cuales las colmenas se enfrenten a ausencia de polen (escenario altamente probable considerando las grandes extensiones de monocultivos y sus períodos de floración), se despoblarían corriendo riesgo de colapsar. El efecto positivo de la alimentación con polen también se vio reflejado en la expresión de los marcadores vinculados a la nutrición y comportamiento de las abejas (vg, *mrjp1* y *mfe*). Por otro lado, considerando que colmenas ubicadas en plantaciones de *E. grandis* se debilitan debido a la baja calidad nutricional del polen de estos árboles (Somerville, 2001; Somerville & Nicol, 2006; Invernizzi *et al.*, 2011a, 2020; Mendoza *et al.*, 2012), se esperaba observar un efecto negativo de la alimentación con este polen en la supervivencia y fisiología de las abejas en comparación a abejas alimentadas con los restantes pólenes utilizados. Sin embargo, la similar supervivencia observada entre abejas alimentadas con los distintos pólenes sugiere que el polen de estos árboles no es necesariamente peor que un polifloral. De todos modos, este resultado se obtuvo con abejas confinadas en laboratorio. En el estudio realizado a nivel

de campo (ver más adelante) se evidenciaron diferencias a varios niveles en colonias que disponían de ambos pólenes.

En cuanto a la infección por *N. ceranae*, se comprobó su efecto negativo en la supervivencia de las abejas, independientemente de la dieta recibida. La infección con este microsporidio aumentó los niveles de expresión de *vg* y *mrjp1*, respuesta que se da en la primera etapa de vida y se agota rápidamente. Dicha respuesta estaría vinculada a la remoción de radicales tóxicos y al aumento en el metabolismo de las abejas asociado a la infección (Amdam *et al.*, 2004; Higes *et al.*, 2007).

La alimentación con polen aumentó la expresión del gen *ppo* que codifica para la enzima polifeniloxidasas (principalmente en el segundo ensayo), mientras la alimentación con polen de *E. grandis* reprimió la expresión de *him*. Teniendo en cuenta que en diversos estudios en los que se han utilizado distintos tipos de polen se han obtenido similares resultados con otros marcadores inmunitarios (Alaux *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013; Castelli, 2017), es posible proponer que los mecanismos inmunológicos se activen o depriman frente al consumo de ciertos compuestos presentes en el polen.

El hecho que la dinámica de expresión de ciertos genes inmunes no coincidiera en los dos ensayos del capítulo 1 sugiere que este parámetro puede verse afectado por el momento del año en que las abejas son colectadas para la realización de los ensayos. Esto puede deberse a que las abejas se preparan fisiológicamente para las actividades a realizar en verano e invierno (Steinmann *et al.*, 2015).

En estas condiciones de laboratorio, los niveles de infección con *N. ceranae* dependieron de la dieta mostrando un mayor nivel en las abejas alimentadas con polen, coincidiendo con estudios previos (Porrini *et al.*, 2011; Basualdo *et al.*, 2014a; Jack *et al.*, 2016). Esto sugiere que si bien una mejor nutrición promueve la replicación de *Nosema* spp., las consecuencias negativas de dicha infección son controladas por abejas bien nutridas ya que igualmente logran una mejor supervivencia.

Por otro lado, la *him* y *ppo* fueron los únicos dos genes inmunes cuya expresión aumentó en abejas infectadas con *N. ceranae*, siendo este aumento dependiente del tiempo. Esto sugiere que dicha respuesta inmune sea una consecuencia del aumento de los niveles de infección con *N. ceranae* y confirma que la *him* es un mecanismo cuya expresión se activa en las abejas *A. mellifera* frente a la infección con patógenos

(Doublet *et al.*, 2017). A pesar de que la expresión de estos genes se activó frente a la infección, el aumento en su expresión no contuvo la reproducción de este microsporidio.

Por otro lado, se encontró que el polen polifloral promovió la adquisición de bacterias de la familia Enterobacteraceae (patógenos oportunistas) y se comprobó que el contacto con abejas nodrizas permite la adquisición de una mayor abundancia de grupos bacterianos intestinales benéficos para las abejas, como *Bifidobacterium ateroirdes* y *Lactobacillus apis*. Dichos grupos microbianos, junto con el procesamiento del polen por parte de las nodrizas y el suministro de las proteínas presentes en el polen en forma de jalea real, pueden ser lo que les permite a las abejas recién emergidas asimilar ciertos tipos de pólenes, neutralizar posibles componentes tóxicos que pudiera haber en él y/o disminuir la proporción de bacterias potencialmente patógenas como las Enterobacteraceae. Además, el hecho que el polen polifloral 1 que resultara tóxico en condiciones de laboratorio, permitiera que, a nivel de campo, colonias sometidas a estrés nutricional presentaran mayor fortaleza, sugiere que estas interacciones con nodrizas son claves en la homeostasis colonial.

En el primer ensayo de campo, se comprobó que el estrés nutricional asociado a plantaciones de *E. grandis* disminuye la población de abejas adultas y cría y aumenta los niveles de infección con *N. ceranae*. Colmenas sometidas a estrés nutricional presentaron menor nivel de infección con virus y mayores niveles de *N. ceranae*. Teniendo en cuenta que estos resultados se corresponden con los obtenidos a nivel de laboratorio, se abre una línea de investigación para profundizar en este aspecto. Los efectos del estrés nutricional tuvieron consecuencias a mediano plazo, ya que las colmenas sometidas a dicho estrés no se recuperaron de igual manera en primavera como lo hicieron las colmenas suplementadas con polen polifloral.

El segundo ensayo de campo permitió comprobar que los efectos negativos del estrés nutricional no son fácilmente reversibles, al menos mediante la estrategia utilizada en este ensayo.

Por último, teniendo en cuenta i) que el porcentaje de proteínas del polen de *E. grandis* es alto al principio de la floración pero disminuye con el tiempo (Invernizzi *et al.*, 2011; esta tesis), ii) las diferencias en los resultados obtenidos en los ensayos en condiciones controladas mencionadas anteriormente, y iii) los resultados obtenidos en

los ensayos de campo, permiten plantear un modelo teórico explicando las razones por las cuales las colonias ubicadas en las plantaciones de *E. grandis* se debilitan sensiblemente. Dicho modelo consiste en que, en otoño, la dinámica y funcionamiento colonial se está preparando para afrontar el invierno, por lo que cambia la fisiología de las abejas, las reservas nutricionales y la organización colonial. En ese momento, las colonias son trasladadas a un ambiente que ofrece un gran flujo nectarífero por lo que la organización colonial cambia abruptamente y las abejas con reservas nutricionales suficientes para sobrevivir todo el invierno dentro de las colonias deben comenzar a pecorear para acopiar alimentos. La cantidad de cría en estos ambientes y la calidad nutricional del polen disponible disminuye en el tiempo, por lo que se producen generaciones de cría con pocos individuos y pobres desde el punto de vista nutricional para afrontar el invierno. Además, los niveles de infección con *Nosema* spp. aumentan, disminuyendo la supervivencia de las abejas y la población de las colonias, por lo que las mismas empiezan el invierno con gran debilidad desde el punto de vista poblacional y sanitario. Ambos factores junto con la desorganización social y la importancia de esta organización para mantener la homeostasis nutricional y microbiana de la colonia contribuyen a que las mismas no pasen el invierno en las mejores condiciones y no logren recuperarse de forma adecuada en la primavera siguiente.

Este trabajo contribuye a la comprensión de los efectos de la alimentación en la fisiología y sanidad de abejas a nivel individual, y profundiza en los factores que afectan dicha nutrición. Además, constituye el primer trabajo que prueba, en condiciones de campo, la interacción entre el estrés nutricional y la salud de las colonias de abejas. Por otro lado, los efectos de la suplementación con polen polifloral durante el período de estrés nutricional en la fortaleza y salud de las colmenas a corto y mediano plazo, permiten considerar esta estrategia para ser recomendada a nivel productivo. Para su aplicación, es importante considerar las medidas adecuadas de manejo para evitar el contagio de enfermedades.

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

9.1. Conclusiones

El estrés nutricional extremo disminuyó la supervivencia de las abejas, así como la expresión de genes vinculados al estado nutricional, comportamental y a la inmunidad celular (*vg*, *mrjp1*, *mfe* y *ppo*).

En condiciones de laboratorio, los dos pólenes monoflorales utilizados afectan de forma similar la supervivencia diaria de las abejas y la expresión de los marcadores de nutrición y comportamiento (*vg* y *mrjp1*) y la respuesta inmune celular (*ppo*), mientras que el polen de *E. grandis* deprimió la respuesta inmune humoral de las abejas.

La infección con *N. ceranae* disminuyó la supervivencia de las abejas y activó en corto plazo la expresión de marcadores vinculados a la nutrición y comportamiento (*vg* y *mrjp1*). La infección también aumentó la expresión de *him*, marcador asociado a la inmunidad humoral. Sin embargo, a pesar de dispararse esta respuesta inmune, los niveles de *N. ceranae* aumentan por lo que la respuesta no es suficiente para contener a reproducción de este microsporidio.

Cuando las abejas están coinfectadas con *N. ceranae* y DWV, existe una interacción negativa entre ambos patógenos, siendo *N. ceranae* el patógeno beneficiado de esta interacción. Estos resultados de laboratorio se corroboraron a nivel de campo, ya que las colonias que tuvieron mayor nivel de infección con este microsporidio, presentaron menores niveles de infección viral.

Las interacciones entre abejas recién emergidas y nodrizas juegan un rol clave en la nutrición de las abejas, procesando compuestos del polen y transfiriéndolos a abejas más jóvenes incapaces de hacerlo o contribuyendo al establecimiento de una comunidad microbiana intestinal estable y característica de las abejas.

Se comprobó que el polen de *E. grandis* varía en cuanto a su contenido de proteínas durante el período de floración, pudiendo tener buenos valores nutricionales al comienzo de dicha floración y decaer durante el transcurso de la misma.

A nivel de campo, el estrés nutricional afectó significativamente la fortaleza de la colmena, disminuyendo la población de abejas adultas y de cría a corto y mediano plazo. Si bien no se observó un efecto significativo en el porcentaje de pérdidas de

colonias, las colonias se retiraron de la forestación al finalizar la floración, por lo que no se puede descartar un mayor impacto en el caso que las colmenas se hubieran mantenido en dichas condiciones.

El estrés nutricional favoreció el aumento de los niveles de infección con *N. ceranae*, lo que también repercute en la población de abejas adultas. Por otro lado, colmenas sometidas a estrés nutricional presentaron menores niveles de infección con virus que las colmenas suplementadas.

Por último, el impacto del estrés nutricional en la fortaleza y sanidad de las colonias no pudo ser mitigado por la suplementación nutricional en invierno.

9.2. Perspectivas

Los resultados obtenidos en la presente tesis motivan a profundizar tanto en aspectos básicos vinculados al efecto de la nutrición en las colonias, como en aspectos vinculados a estrategias de manejo de las colonias a nivel de campo.

Teniendo en cuenta que abejas alimentadas con polen de *E. grandis* tienen el sistema inmune humoral deprimido, sería interesante comprobar si estos resultados se mantienen en condiciones de campo. Para esto, es necesario analizar un gran número de abejas de edad controlada provenientes de colmenas bajo condiciones de estrés nutricional y su comparación con abejas bien nutridas. Este ensayo se realizó en el marco del proyecto ANII FMV 125435 “Administración de polen polifloral como estrategia para mejorar la salud y productividad de colonias de abejas melíferas”, y los resultados están en proceso de análisis.

Por otro lado, teniendo en cuenta que los genes vinculados a la nutrición como *vg* y *mrjp1* varían a lo largo de la vida de las abejas y en asociación a los cambios de comportamiento, sería interesante profundizar en la biología de las abejas en condiciones de campo y comparar la variación en estos marcadores en abejas a nivel de campo y laboratorio. En verano de 2020, se realizó un ensayo con el fin de abordar esta temática y las muestras obtenidas se encuentran en procesamiento.

Considerando que a nivel de campo no se observaron diferencias en la producción de miel entre ambos grupos de colmenas analizados a pesar de que colonias suplementadas con polen polifloral presentaron mayor población de abejas, sería interesante evaluar el momento oportuno de suplementación con el fin de mejorar la productividad, fortaleza y sanidad de las colonias.

Por último, teniendo en cuenta que la obtención del polen polifloral en buenas condiciones puede resultar difícil para productores profesionales que manejan gran cantidad de colmenas, sería interesante analizar la efectividad de suplementos nutricionales disponibles en el mercado para contrarrestar los efectos negativos de la apicultura asociada a los montes de *E. grandis*. En este sentido, se presentó un proyecto INIA FPTA para abordar este tema.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriculture & Environment Research Unit. University of Hertfordshire. (2007) Pesticides Properties DataBase. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/>.
- Al-Tikrity, W.S., Benton, A.W., Hillman, R.C. & Clarke, W.W. (1972) The relationship between the amount of unsealed brood in honeybee colonies and their pollen collection. *Journal of Apicultural Research*, **11**, 9–12.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. & Le Conte, Y. (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, **6**, 562–565.
- Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H. & Le Conte, Y. (2011a) Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*, **12**, 496.
- Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J.L. & Conte, Y. Le. (2011b) Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **106**, 380–385.
- Amdam, G. V., Lene, A.T.O., Seehuusb, S.C., Fondrka, M.K., Norbergb, K. & Hartfelderc, K. (2005) Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, **40**, 939–947.
- Amdam, G. & Omholt, S. (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of theoretical biology*, **223**, 451–464.
- Amdam, G. V., Simoes, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T.B.L. & Omholt, S.W. (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, **39**, 767–773.
- Amdam, G. V., Ihle, K.E. & Page, R.E. (2010) Regulation of honeybee worker (*Apis mellifera*) life histories by vitellogenin. *Hormones, Brain and Behavior Online*, 1003–1027.
- Amdam, G.V. & Omholt, S.W. (2002) The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, **216**, 209–228.
- Ament, S. a, Corona, M., Pollock, H.S. & Robinson, G.E. (2008a) Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 4226–4231.
- Ament, S.A., Corona, M., Pollock, H.S. & Robinson, G.E. (2008b) Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 4226–4231.
- Ament, S.A., Wang, Y. & Robinson, G.E. (2010) Nutritional regulation of division of labor in honey bees: Toward a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **2**, 566–576.
- 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*). *Insectes Sociaux*, **58**, 431–444.
- Anderson, K.E., Carroll, M.J., Sheehan, T., Mott, B.M., Maes, P. & Corby-Harris, V. (2014) Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology*, **23**, 5904–5917.
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P. & Antúnez, K. (2016) Prevalence and distribution of honey bee pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, **54**, 532–540.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E. & Zunino, P. (2005) Detection of Chronic bee paralysis virus and Acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **90**, 69–72.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G. & Zunino, P. (2006) Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, **93**, 67–70.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. & Higes, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, **11**, 2284–2290.
- Antúnez, K., Mendoza, Y., Santos, E. & Invernizzi, C. (2013) Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 227–234.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martín-Hernández, R. & Zunino, P. (2015) Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*, **70**, 522–533.
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., VanEngelsdorp, D. & Zunino, P. (2016) Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, **2014**, 1–7.
- Ares, A.M., Nozal, M.J., Bernal, J.L., Martín-Hernández, R., M.Higes & Bernal, J. (2012) Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **899**, 146–153.
- Arien, Y., Dag, A., Zarchin, S., Masci, T. & Shafir, S. (2015) Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 201517375.
- Arnold, S.E.J., Idrovo, M.E.P., Arias, L.J.L., Belmain, S.R. & Stevenson, P.C. (2014) Herbivore defence compounds occur in pollen and reduce bumblebee colony fitness. *Journal of Chemical Ecology*, **40**, 878–881.
- Asgari, S. & Johnoson, K. (2010) *Insect Virology*. P. in.: Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Bailey, L. & Gibbs, a. J. (1964) Acute infection of bees with Paralysis Virus. *Journal of Insect Pathology*, **6**, 395–407.
- Bailey, L. & Milne, R.G. (1969) The multiplication regions and interaction of Acute and Chronic bee-paralysis viruses in adult honey bees. *Journal of General Virology*, **4**,

- 9–14.
- Bailey, L. & Woods, R.D. (1974) Three previously undescribed viruses from the honey bee. *Journal of General Virology*, **25**, 175–186.
- Bailey, L. & Woods, R.D. (1977) Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *Journal of General Virology*, **37**, 175–182.
- Bailey, L., Gibbs, A.J. & Woods, R.D. (1963) Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, **21**, 390–395.
- Bailey, L., Gibbs, a J. & Woods, R.D. (1964) Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, **23**, 425–429.
- Barker, R.J. (1971) The influence of food inside the hive on pollen collection by a honeybee colony. *Journal of Apicultural Research*, **10**, 23–26.
- Barker, R.J. (1977) Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to honey bees. *Journal of Nutrition*, **107**, 1859–1862.
- Barker, R.J. & Lehner, Y. (1974) Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Zoology*, **187**, 277–285.
- Barker, R.J. & Lehner, Y. (2000) Laboratory vomparison of high fructose corn syrup, grape syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. *Apidologie*, **9**, 111–116.
- Basualdo, M., Barragán, S. & Antúnez, K. (2014a) Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental microbiology reports*, **6**, 396–400.
- Basualdo, M., Barragán, S. & Antúnez, K. (2014b) Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Reports*, **6**, 396–400.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *Journal of Statistics Software*, **67**, 1–48.
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J.R. & Dalmon, A. (2020) Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, **11**, 239.
- Bee Austria. (2018) Structure of beekeeping in Austria. *Number of stocks and imkers and bee villages*. <<https://www.biene-oesterreich.at/daten-und-zahlen+2500++1000247>> (4 December 2019).
- Biganski, S., Kurze, C., Müller, M.Y. & Moritz, R.F.A. (2018) Social response of healthy honeybees towards *Nosema ceranae*-infected workers: care or kill? *Apidologie*, **49**, 325–334.
- Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. (1996) The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers.

- Journal of Apicultural Research*, **35**, 27–36.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (1998) Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *BMJ (Clinical research ed.)*, 317:1572.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (2004) The logrank test. *BMJ (Clinical research ed.)*, **328**, 1073.
- Boecking, O. & Spivak, M. (1999) Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **30**, 141–158.
- Bogdanov, S. (2009) Honey Composition. Pp. 1–10 in: *The Honey Book*.
- Bogdanov, S., Tomislav, J., Sieber, R. & Gallmann, P. (2008) Honey for nutrition and health: a review. *American Journal of the College of Nutrition*, **27**, 677–689.
- Bomtorin, A.D., Mackert, A., Rosa, G.C.C., Moda, L.M., Martins, J.R., Bitondi, M.M.G., Hartfelder, K. & Simões, Z.L.P. (2014) Juvenile hormone biosynthesis gene expression in the corpora allata of honey bee (*Apis mellifera* L.) female castes. *PLoS ONE*, **9**, e86923.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A. & Higes, M. (2013) *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, **44**.
- Bowen-Walker, P., Martin, S. & Gunn, A. (1999) The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of invertebrate pathology*, **73**, 101–6.
- Bowen-Walker, P.L. & Gunn, A. (2001) The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **101**, 207–217.
- Brenna, J.T. (2011) Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. *Maternal & Child Nutrition*, **7**, 59–79.
- Brodschneider, R. & Crailsheim, K. (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, **41**, 278–294.
- Brodschneider, R., Gray, A., van der Zee, R., Adjlane, N., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Crailsheim, K., Dahle, B., Danihlík, J., Danneels, E., de Graaf, D.C., Dražić, M.M., Fedoriak, M., Forsythe, I., Golubovski, M., Gregorc, A., Grzęda, U., Hubbuck, I., İvgin Tunca, R., Kauko, L., Kilpinen, O., Kretavicius, J., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Mutinelli, F., Peterson, M., Otten, C., Ozkirim, A., Raudmets, A., Simon-Delso, N., Soroker, V., Topolska, G., Vallon, J., Vejsnæs, F. & Woehl, S. (2016) Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research*, **55**, 375–378.
- Brodschneider, R., Gray, A., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Dahle, B., de Graaf, D.C., Maja Dražić, M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., Grzęda, U., Hetzroni, A., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Aurelio Medina-Flores, C., Mutinelli, F., Raudmets, A., A Ryzhikov, V., Simon-Delso, N., Stevanovic, J.,

- Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wöhl, S., Zammit-Mangion, M. & Danihlík, J. (2018) Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research*, **57**, 452–457.
- Burges, H.D., Canning, E.U. & Hulls, I.K. (1974) Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament. *Journal of Invertebrate Pathology*, **23**, 135–139.
- Buttstedt, A., Moritz, R.F.A. & Erler, S. (2013) More than royal food - Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Frontiers in Zoology*, **10**, 1–10.
- Camazine, S. (1993) The regulation of pollen foraging by honey bees: how foragers assess the colony's need for pollen. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **32**, 265–272.
- Camazine, S., Crailsheim, K., Hrassnigg, N., Robinson, G.E., Leonhard, B. & Kropiunigg, H. (1998) Protein trophallaxis and the regulation of pollen foraging by honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, **29**, 113–126.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., 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., Yatsunencko, T., Zaneveld, J. & Knight, R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, **7**, 335–6.
- Cardinal, S., Straka, J. & Danforth, B.N. (2010) Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 16207–11.
- Cariveau, D.P., Powell, E.J., Koch, H., Winfree, R. & Moran, N. a. (2014) Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *The ISME journal*, **8**, 1–11.
- Carreck, N. & Neumann, P. (2010) Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 1.
- Carreck, N.L., Ball, B. V & Martin, S. (2010) Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 93–94.
- Carroll, M.J., Brown, N., Goodall, C., Downs, A.M., Sheenan, T.H. & Anderson, K.E. (2017) Honey bees preferentially consume freshlystored pollen. *PLoS ONE*, **12**, 1–21.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. & Tempst, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO journal*, **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*). *European journal of biochemistry / FEBS*, **187**, 381–386.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F. & Tempst, P. (1993) Functional and chemical characterization of Himenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-

- inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 7044–7054.
- Castelli, L. (2017) Una aproximación al estudio de la comunidad microbiana de las abejas melíferas. Univerisdad de la Republica.
- Castelli, L., Branchiccela, B., Santos, E., Zunino, P. & Antúnez, K. (2015) Efecto de la nutrición en la inmunidad y la comunidad microbiana intestinal de abejas melíferas sanas. P. in: *XI Encuentro Nacional de Microbiólogos*. Montevideo.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D. & Pettis, J.S. (2012) Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 1090–1095.
- Chauzat, M.-P., Laurent, M., Riviere, M.-P., Saligeon, C., Hendrikx, P. & Ribiere-Chabert, M. (2014) *A pan European epidemiological study on honeybee colony losses*. 1–30 pp.
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R. & de Graaf, D.C. (2017) *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, *Nosematidae*), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology*, **61**, 13–19.
- Chen, Y., Pettis, J., Evans, J., Kramer, M. & Fedlaufer, M. (2004a) Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, **35**, 441–448.
- Chen, Y., Pettis, J., Evans, J., Kramer, M. & Feldlaufer, M. (2004b) Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, **35**, 441–448.
- Chen, Y., Evans, J. & Feldlaufer, M. (2006) Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **92**, 152–159.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B. & Pettis, J.S. (2008) *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, **97**, 186–188.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M. & Pettis, J.S. (2009a) Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **101**, 204–209.
- Chen, Y.P. & Siede, R. (2007) Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research*, **70**, 33–80.
- Chen, Y.P., Evans, J.D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D. & Pettis, J.S. (2009b) Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **56**, 142–147.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Corona, M., Chen, W.P., Li, C.J., Spivak, M., Visscher, P.K., DeGrandi-Hoffman, G., Boncristiani, H., Zhao, Y., vanEngelsdorp, D., Delaplane, K., Solter, L., Drummond, F., Kramer, M., Lipkin, W.I., Palacios, G., Hamilton, M.C., Smith, B., Huang, S.K., Zheng, H.Q., Li, J.L., Zhang, X., Zhou, A.F., Wu, L.Y., Zhou, J.Z., Lee, M.L., Teixeira, E.W., Li, Z.G. & Evans, J.D. (2014) Israeli Acute Paralysis Virus: Epidemiology, Pathogenesis and Implications for Honey Bee Health.

PLoS Pathogens, **10**.

- Clermont, A., Eickermann, M., Kraus, F., Hoffmann, L. & Beyer, M. (2015) Correlations between land covers and honey bee colony losses in a country with industrialized and rural regions. *Science of the Total Environment*, **532**, 1–13.
- Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. (2013) Gravimetria-Method 14.
- Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B. & Ourisson, G. (1989) Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science*, **245**, 638–639.
- Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, C. & Ayotte, T. (2018) Honey bee (*Apis mellifera*) nurses do not consume pollens based on their nutritional quality. *PLoS ONE*, **13**, 1–21.
- Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. & Evans, J.D. (2009) Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*, **5**.
- Corona, M., Velarde, R. a, Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. a & Robinson, G.E. (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 7128–7133.
- Corona, M., Libbrecht, R. & Wheeler, D.E. (2016) Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in social insects. *Current Opinion in Insect Science*, **13**, 55–60.
- Costa, C., Tanner, G., Lodesani, M., Maistrello, L. & Neumann, P. (2011) Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *Journal of Invertebrate Pathology*, **108**, 224–225.
- Crailsheim, K. (1988a) Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, **34**, 839–845.
- Crailsheim, K. (1988b) Regulation of food passage in the intestine of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, **34**, 85–90.
- Crailsheim, K. (1988c) Transport of leucine in the alimentary canal of the honeybee (*Apis mellifera* L.) and its dependence on season. *Journal of Insect Physiology*, **34**, 1093–1100.
- Crailsheim, K. (1990a) Protein synthesis in the honeybee (*Apis mellifera* L.) and trophallactic distribution of jelly among imagos in laboratory experiments. *Zoologische Jahrbücher*, **94**, 303–312.
- Crailsheim, K. (1990b) The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie*, **21**, 417–429.
- Crailsheim, K. (1992) The flow of jelly within a honeybee colony. *Journal of Comparative Physiology B*, **162**, 681–689.
- Crailsheim, K. (1998) Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, **29**, 97–112.

- Crailsheim, K., Schneider, L.H.W., Hrasnigg, N., Böhmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R. & Schöffmann, B. (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, **38**, 409–419.
- Crane, E. (1990) *Bees and beekeeping: science, practice and world resources*. P. in.: Heinemann Newnes, Oxford.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O. & Schmid-Hempel, P. (2007) Social Immunity. *Current Biology*, **17**, 693–702.
- Cremonesi, T.M., De Jong, D. & Bitondi, M.M.G. (1998) Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Himenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, **91**, 1284–1289.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L. & Neumann, P. (2012a) Dead or alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 981–987.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L. & Neumann, P. (2012b) Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*, **7**, e32151.
- DeGrandi-Hoffman, G. & Chen, Y. (2015) Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, **10**, 170–176.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E. & Huang, M.H. (2010) The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, **56**, 1184–1191.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Rivera, R., Carroll, M., Chambers, M., Hidalgo, G. & de Jong, E.W. (2016) Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements. *Apidologie*, **47**, 186–196.
- DeGrandi-Hoffman, G., Gage, S.L., Corby-Harris, V., Carroll, M., Chambers, M., Graham, H., Watkins deJong, E., Hidalgo, G., Calle, S., Azzouz-Olden, F., Meador, C., Snyder, L. & Ziolkowski, N. (2018) Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology*, **109**, 114–124.
- Delaplane, K.S., Steen, J. Van Der & Guzman-novoa, E. (2013) Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–12.
- Dewick, P.M. (2002) *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. P. in.: Wiley, 507 pp.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P. & Ellis, J.D. (2013) Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–54.
- Dolezal, A.G., Carrillo-Tripp, J., Allen Miller, W., Bonning, B.C. & Toth, A.L. (2016) Intensively cultivated landscape and varroa mite infestation are associated with reduced honey bee nutritional state. *PLoS ONE*, **11**, 1–13.
- Doner, L.W. (1977) The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and*

- Agriculture*, **28**, 443–456.
- Donze, G. & Guerin, P.M. (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa mites* parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **34**, 305–319.
- Doublet, V., Natsopoulou, M.E., Zschiesche, L. & Paxton, R.J. (2015) Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, **124**, 31–34.
- Doublet, V., Poeschl, Y., Gogol-Döring, A., Alaux, C., Annoscia, D., Aurori, C., Barribeau, S., Bedoya-Reina, O., Brown, M., Bull, J., Flenniken, M., Galbraith, D., Genersch, E., Gisder, S., Grosse, I., Holt, H., Hultmark, D., Lattorff, H.M., Le Conte, Y., Manfredini, F., McMahon, D., Moritz, R., Nazzi, F., Niño, E., Nowick, K., van Rij, R., Paxton, R. & Grozinger, C. (2017) Unity in defence: Honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics*, **18**, 207.
- Dreller, C. & Tarpy, D.R. (2000) Perception of the pollen need by foragers in a honeybee colony. *Animal Behaviour*, **59**, 91–96.
- Dreller, C., Page Jr., R.E. & Fondrk, M.K. (1999) Regulation of pollen foraging in honeybee colonies: effects of young brood, stored pollen, and empty space. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **45**, 227–233.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.L., Plettner, E., Belzunces, L.P. & Le Conte, Y. (2010) *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, **36**, 522–525.
- Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.H., Martín-Hernández, R., Botas, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F.A., Le Conte, Y. & Alaux, C. (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, **7**.
- Eckert, J.E. (1961) Acarapis mites of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Insect Pathology*, **3**, 409–425.
- Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **26**, 2460–1.
- Ellis, J.D., Evans, J.D. & Pettis, J. (2010) Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 134–136.
- Elsik, C.G., Worley, K.C., Bennett, A.K., Beye, M., Camara, F., Childers, C.P., de Graaf, D.C., Debyser, G., Deng, J., Devreese, B., Elhaik, E., Evans, J.D., Foster, L.J., Graur, D., Guigo, R., Hoff, K., Holder, M.E., Hudson, M.E., Hunt, G.J., Jiang, H., Joshi, V., Khetani, R.S., Kosarev, P., Kovar, C.L., Ma, J., Maleszka, R., Moritz, R.F.A., Munoz-Torres, M.C., Murphy, T.D., Muzny, D.M., Newsham, I.F., Reese, J.T., Robertson, H.M., Robinson, G.E., Rueppell, O., Solovyev, V., Stanke, M., Stolle, E., Tsuruda, J.M., Vaerenbergh, M., Waterhouse, R.M., Weaver, D.B., Whitfield, C.W., Wu, Y., Zdobnov, E.M., Zhang, L., Zhu, D., Gibbs, R.A., Gibbs, R.A. & Honey Bee Genome Sequencing Consortium. (2014) Finding the missing honey bee

- genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*, **15**, 86.
- Emery, O., Schmidt, K. & Engel, P. (2017) Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular ecology*, **26**, 2576–2590.
- Engel, P. & Moran, N.A. (2013a) Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut microbes*, **4**, 60–65.
- Engel, P. & Moran, N.A. (2013b) The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**, 699–735.
- Engel, P., Martinson, V.G. & Moran, N. a. (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 11002–11007.
- Engel, P., Stepanauskas, R. & Moran, N. (2014) Hidden diversity in honey bee gut symbionts detected by single-cell genomics. *PLoS Genetics*, **10**.
- Esser, D., Lange, J., Marinos, G., Sieber, M., Best, L., Prasse, D., Bathia, J., Rühlemann, M.C., Boersch, K., Jaspers, C. & Sommer, F. (2019) Functions of the microbiota for the physiology of animal metaorganisms. *Journal of Innate Immunity*, **11**, 393–404.
- Evans, J., 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 defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, **15**, 645–656.
- Evans, J.D. & Spivak, M. (2010) Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**.
- Fewell, J.H. & Winston, M.L. (1992) Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology Sociobiol*, **30**, 387–393.
- Fleming, J.C., Schmehl, D.R. & Ellis, J.D. (2015) Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema* spp. in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE*, **10**, 1–14.
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H. & Gerig, L. (1982) Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, **28**, 61–68.
- Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., Alaoui, H. El, Brunet, J.L., Delbac, F. & Biron, D.G. (2013) Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution*, **17**, 188–194.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019) *FAOSTAT statistical database*.
- Fox, J. (2016) *Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models*. P. in.: 3rd edition. Sage.
- Franzen, C. (2004) Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, **20**, 275–279.

- Free, J.B. (1956) A study of the stimuli which release the food begging and offering responses of worker honeybees. *The British Journal of Animal Behaviour*, **4**, 94–101.
- Free, J.B. (1957) The transmission of food between worker honeybees. *The British Journal of Animal Behaviour*, **5**, 41–47.
- Free, J.B. & Williams, I.H. (1971) The effect of giving pollen and pollen supplement to honeybee colonies on the amount of pollen collected. *Journal of Apicultural Research*, **10**, 87–90.
- Fries, I. (1988) Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey Bee. *Apidologie*, **19**, 319–328.
- Fries, I. (1992) Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*, **23**, 61–70.
- Fries, I. (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**.
- Fries, I. (2015) *Nosema apis*—A parasite in the honey bee colony. *Bee World*, **74**, 5–19.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S.B. & Pieniasek, N.J. (1996) *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, *Nosematidae*), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Himenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, **32**, 356–365.
- Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y.P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R.J., Tanner, G., Webster, T.C. & Williams, G.R. (2013) Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–28.
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J. & Vaissière, B.E. (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, **68**, 810–821.
- Genersch, E. (2010a) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**.
- Genersch, E. (2010b) Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 87–97.
- Genersch, E. & Aubert, M. (2010) Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, **41**, 41:54.
- Ghosh, R.C., Ball, B. V., Willcocks, M.M. & Carter, M.J. (1999) The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: An insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, **80**, 1541–1549.
- Gilliam, M. (1990) Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera*, caused by the fungus, *Ascosphaera apis*: A review of past and current research. *Proceedings and abstracts, Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia, 20-24 August 1990.*, 398–402.
- Gilliam, M. (1997) Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, **155**, 1–10.

- Gómez-Moracho, T., Bartolomé, C., Bello, X., Martín-Hernández, R., Higes, M. & Maside, X. (2015) Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infection, Genetics and Evolution*, **31**, 87–94.
- González, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A. & Jiménez, M. (2005) Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 1–9.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C. & Rotheray, E.L. (2015) Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, **347**, 1255957.
- Govan, V.A., Leat, N., Allsopp, M. & Davison, S. (2000) Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology*, **277**, 457–463.
- Gray, A., Brodschneider, R., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo, R., F. Coffey, M., Cornelissen, B., Amaro da Costa, C., Csáki, T., Dahle, B., Danihlík, J., Dražić, M.M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., de Graaf, D., Gregorc, A., Johannesen, J., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Medina-Flores, C.A., Mutinelli, F., Patalano, S., Petrov, P., Raudmets, A., Ryzhikov, V.A., Simon-Delso, N., Stevanovic, J., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnaes, F., Williams, A., Zammit-Mangion, M. & Soroker, V. (2019) Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal of Apicultural Research*, **0**, 1–7.
- De Groot, A.P. (1953) Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.). *Physiologia comparata et oecologia*, **3**, 197–285.
- Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G. V., Barchuk, A.R., Omholt, S., Simões, Z.L.P. & Hartfelder, K. (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*, **579**, 4961–4965.
- Hagen, S.R., Augustin, J., Grings, E. & Tassinari, P. (1993) Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of free amino acids in biological samples. *Food Chemistry*, **46**, 319–323.
- Hanover, L.M. & White, J.S. (1993) Manufacturing, composition, and applications of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **58**, 724S-732S.
- Hartfelder, K. & Engels, W. (1998) Social Insect Polymorphism: Hormonal Regulation of Plasticity in Development and Reproduction in the Honeybee. *Current topics in developmental biology*, **40**, 45–77.
- Harwood, G., Amdam, G. & Freitak, D. (2019) The role of Vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, **112**, 90–100.
- Haszonits, O. & Crailsheim, K. (1990) Uptake of l-leucine into isolated enterocytes of the honeybee (*Apis mellifera* L.) depending on season. *Journal of Insect Physiology*, **36**, 835–842.
- Haydak, M.H. (1970) Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology*, **15**, 143–156.

- Helvig, C., Koener, J. F., Unnithan, G. C., Feyereisen, R. 2004. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 4024-4029.
- Hendriksma, H.P., Shafir, S. (2016) Honey bee foragers balance colony nutritional deficiencies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **70**, 509–517.
- Herbert, E.W.J. (1992) Honey bee nutrition. Pp. 197–233 in: *The Hive and the Honey Bee*. J.E. Graha. Hamilton, Dadant e Sons Inc., Illinois.
- Hernández López, J., Schuehly, W., Crailsheim, K. & Riessberger-Gallé, U. (2014) Trans-generational immune priming in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**.
- Higes, M., Martín-Hernández, R. & Meana, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, **92**, 93–95.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R. & Meana, A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, **94**, 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G. & Meana, A. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, **10**, 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M.J., Mayo, R. & Bernal, J.L. (2009) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, **1**, 110–113.
- Higes, M., Martín-Hernández, R. & Meana, A. (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, **41**, 375–392.
- Higes, M., Nozal, M.J., Alvaro, A., Barrios, L., Meana, A., Martín-Hernández, R., Bernal, J.L. & Bernal, J. (2011) The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*, **42**, 364–377.
- Higes, M., Juarranz, A., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botías, C., Meana, A., García-Palencia, P. & Martín-Hernández, R. (2013a) Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: *Nosematidae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology reports*, **5**, 530 – 536.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. & Martín-Hernández, R. (2013b) *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, **5**, 17–29.
- Hillyer, J. (2016) Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*, **58**, 102–118.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A. & Grozinger, C.M. (2013) Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, **14**,

799.

- Hong, S. & Pedersen, P.L. (2008) ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **72**, 590–641.
- Hrassnigg, N. & Crailsheim, K. (2005) Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, **36**, 255–277.
- International Committee on the Taxonomy of Viruses. (2014) Virus taxonomy. <www.ictvonline.org/>.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I.H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G. & Mendoza, Y. (2009) Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, **101**, 150–153.
- Invernizzi, C., Santos, E., García, E., Daners, G., Di Landro, R., Saadoun, A. & Cabrera, C. (2011a) Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in Eucalyptus grandis plantations. *Archivos de zootecnia*, **60**, 1303–1314.
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J.P., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E. & Zunino, P. (2011b) Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria*, **47**, 15–27.
- Invernizzi, C., Branchiccela, B., Mendoza, Y., Castelli, L., Viera, N., Santos, E., Diaz-Cetti, S. & Antúnez, K. (2020) Apicultura en forestaciones de eucaliptos: una oportunidad con muchos problemas a resolver. P. in: *Biodiversidad En Paisajes Forestados de Uruguay*.
- Jack, C.J., Uppala, S.S., Lucas, H.M. & Sagili, R.R. (2016) Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology*, **87**, 12–19.
- Jankielsohn, A. (2018) The importance of insects in agricultural ecosystems. *Advances in Entomology*, **06**, 62–73.
- Johnson, R.M. (2015) Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology*, **60**, 415–434.
- De Jong, D. (2009) Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *Journal of Apicultural Research*, **48**, 34–37.
- De Jong, D., De Jong, P. & Gonçalves, L.S. (1982) Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, **21**, 165–216.
- Kamakura, M. (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, **473**, 478–483.
- Kaplan, J.K. (2008) Colony collapse disorder - A complex buzz. *Agricultural Research*, 8–11.
- Keeling, P.J. & Fast, N.M. (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu.Rev.Microbiol.*, **56**, 93–116.
- Klein, A.M., 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. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **274**, 303–313.
- Kleinschmidt, G.J. & Kondos, A.C. (1976) Influence of crude protein levels on colony production. *Australasian beekeeper*, 36–39.
- Koch, H. & Schmid-Hempel, P. (2011) Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 19288–92.
- Korst, P.J.A.M. & Velthuis, H.H.W. (1982) The nature of trophallaxis in honeybees. *Insectes Sociaux*, **29**, 209–221.
- Kroon, G.H., van Praagh, J.P. & Velthuis, H.H.W. (1974) Osmotic shock as a prerequisite to pollen digestion in the alimentary tract of the worker honeybee. *Journal of Apicultural Research*, **13**, 177–181.
- Kulhanek, K., Steinhauer, N., Rennich, K., Caron, D.M., Sagili, R.R., Pettis, J.S., Ellis, J.D., Wilson, M.E., Wilkes, J.T., Tarpy, D.R., Rose, R., Lee, K., Rangel, J. & VanEngelsdorp, D. (2017) A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, **56**, 328–340.
- Kurze, C., Le Conte, Y., Dussaubat, C., Erler, S., Kryger, P., Lewkowski, O., Muller, T., Widder, M. & Moritz, R. (2015) *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *Plos ONE*, **10**, e0140174.
- Kwong, W.K. & Moran, N.A. (2015) Evolution of host specialization in gut microbes: The bee gut as a model. *Gut Microbes*, **6**, 214–220.
- Kwong, W.K., Mancenido, A.L. & Moran, N.A. (2017) Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, **4**, 170003.
- Leat, N., Ball, B., Govan, V. & Davison, S. (2000) Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*, **81**, 2111–2119.
- Lee, W.J. & Hase, K. (2014) Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. Nature Publishing Group. *Nature Chemical Biology*. .
- Leonhardt, S. & Bluthgen, N. (2012) The same, but different: pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie*, **43**, 449–464.
- Liersch, S. & Schmid-Hempel, P. (1998) Genetic variation within social insect colonies reduces parasite load. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **265**, 221–225.
- Liu, T.P. (1984) Ultrastructure of the midgut of the worker honey bee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **44**, 282–291.
- Locke, B. (2016) Natural Varroa mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie*, **47**, 467–482.
- Louveaux, J., Maurizio, A. & Vorwohl, G. (1978) Methods of melissopalynology. *Bee World*, **5**, 139–153.
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, **15**, 550.

- Lucas, B. & Sotelo, A. (1980) Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical Biochemistry*, **109**, 192–197.
- Maggi, M., Ruffinengo, S., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I. & Eguaras, M. (2011) Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: Varroa mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, **108**, 815–821.
- Malecová, B., Ramser, J., O'Brien, J.K., Janitz, M., Júdová, J., Lehrach, H. & Šimúth, J. (2003) Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: Computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene*, **303**, 165–175.
- Manning, R. (2001) Fatty acids in pollen: A review of their importance for honey bees. *Bee World*, **82**, 60–75.
- Mao, W., Schuler, M.A. & Berenbaum, M.R. (2011) CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 12657–12662.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E. & Higes, M. (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 6331–6338.
- Martín-Hernández, R., Aránzazu Meana, García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L. & Higes, M. (2009) Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2554–2557.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C. & Higes, M. (2011) Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*, **109**, 605–612.
- Martín-Hernández, R., Higes, M., Sagastume, S., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Budge, G.E., Meana, A. & Boonham, N. (2017) Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS ONE*, **12**.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., Soroker, V. & Higes, M. (2018) *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. P. in: *Environmental Microbiology*. 1302–1329 pp.
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S. & Schroeder, D.C. (2012) Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, **336**, 1304–1306.
- Martin, S.J., Hardy, J., Villalobos, E., Martín-Hernández, R., Nikaido, S. & Higes, M. (2013) Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environmental Microbiology Reports*, **5**, 506–510.
- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S. & Moran, N.A. (2011) A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, **20**, 619–628.

- Martinson, V.G., Moy, J. & Moran, N.A. (2012) Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 2830–2840.
- Mattila, H.R. & Otis, G.W. (2006) Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Himenoptera: Apidae) colonies. *Journal of economic entomology*, **99**, 604–613.
- Mayack, C. & Naug, D. (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, **100**, 185–188.
- Mc Cowen, M., Callender, M. & Lawlis, J. (1951) Fumagillin (H-3), a New Antibiotic with Amebicidal Properties. 202–203.
- McGregor, S.E. (1976) Insect pollination of cultivated crop plants. *Usda*, 849.
- McMenamin, A.J. & Flenniken, M.L. (2018) Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. Elsevier Inc. *Current Opinion in Insect Science*. .
- Mendiburu, F. (2017) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. <<https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>> (15 March 2018).
- Mendoza, Y., Díaz, J., Ramallo, G. & Invernizzi, C. (2012) Incidencia de *Nosema ceranae* durante el invierno en colonias de abejas melíferas retiradas de una forestación de *Eucalyptus grandis*. *Veterinaria*, **48**, 1–49.
- Mendoza, Y., Harriet, J., Campa, J., Katz, H., Ramallo, G., Díaz-cetti, S. & Invernizzi, C. (2013) Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia Uruguay*, **17**, 108–113.
- Mendoza, Y., Antúnez, K., Branchiccela, B., Anido, M., Santos, E. & Invernizzi, C. (2014) *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie*, **45**, 224–234.
- Mendoza, Y., Tomasco, I., Díaz-Cetti, S., Ramallo, G., Chambón, C., Silva, C., Antúnez, K., Branchiccela, B., Maggi, M., Giménez, P. & Invernizz, C. (2016) Varroosis in Uruguay: a case for study. P. in: *Eurbee 7*.
- Mendoza, Y., Diaz-Cetti, S., Ramallo, G., Santos, E., Porrini, M. & Invernizzi, C. (2017) *Nosema ceranae* winter control: study of the effectiveness of different fumagillin treatments and consequences on the strength of honey Bee (Himenoptera: Apidae) colonies. *Journal of economic entomology*, **110**, 1–5.
- Meunier, J. (2015) Social immunity and the evolution of group living in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **370**, 19–21.
- Van Meyel, S., Körner, M. & Meunier, J. (2018) Social immunity: Why we should study its nature, evolution and functions across all social systems. *Current Opinion in Insect Science*, 1–7.
- MGAP. (2019) *Anuario estadístico agropecuario 2019*. 255 pp.
- Michalczyk, M. & Sokół, R. (2014) Nosemosis in honey bees. *POLich Journal of Natural Science*, **29**, 91–99.
- Milani, N. (1999) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. **30**, 229–234.
- de Miranda, J.R. & Fries, I. (2008) Venereal and vertical transmission of deformed wing

- virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, **98**, 184–189.
- de Miranda, J.R. & Genersch, E. (2010) Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, 548–561.
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M. & Giacconi, R. (2000) Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology*, **1**, 133–143.
- 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**, 1–10.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. (2000) Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science*, **290**, 1166–1168.
- Moritz, B. & Crailsheim, K. (1987) Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, **33**, 923–931.
- Morse, R. a & Calderone, N.W. (2000) The value of honey bees as pollinators of U . S . Crops. *Bee Culture*, 1–15.
- Mortensen, A.N., Jack, C.J., Bustamante, T.A., Schmehl, D.R. & Ellis, J.D. (2018) Effects of supplemental pollen feeding on honey bee (Himenoptera: Apidae) colony strength and *Nosema* spp. infection. *Journal of Economic Entomology*, **112**, 60–66.
- Mutti, N.S., Dolezal, A.G., Wolschin, F., Mutti, J.S., Gill, K.S. & Amdam, G. V. (2011) IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. *The Journal of experimental biology*, **214**, 3977–84.
- Naug, D. (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, **142**, 2369–2372.
- Naug, D. & Gibbs, A. (2009) Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, **40**, 595–599.
- Nazzi, F. & Le Conte, Y. (2016) Ecology of *Varroa destructor* , the major ectoparasite of the western honey bee , *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, **61**, 417–432.
- 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 Biology*, **5**, 0673–0677.
- Neumann, P., Pirk, C., Hepburn, H., Solbrig, A., Ratnieks, F., Elzen, P. & Baxter, J. (2001) Social encapsulation of beetle parasites by Cape honeybee colonies (*Apis mellifera capensis* Esch.). *Naturwissenschaften*, **88**, 214–216.
- Nicolson, S.W. (2011) Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, **46**, 197–204.
- Nicolson, S.W. & Human, H. (2008) Bees get a head start on honey production. *Biology letters*, **4**, 299–301.
- Niell, S., Jesús, F., Pérez, C., Mendoza, Y., Díaz, R., Franco, J., Cesio, V. & Heinzen, H. (2015) QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 4484–4492.
- Nilsen, K.-A., Ihle, K.E., Frederick, K., Fondrk, M.K., Smedal, B., Hartfelder, K. & Amdam, G. V. (2011) Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *Journal of Experimental Biology*, **214**, 1488–1497.
- Niu, G., Johnson, R.M. & Berenbaum, M.R. (2011) Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie*, **42**, 79–87.
- OIE World Animal Health Information System. (2019) Varroosis of honey bees. <https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=0&disease_id_hidden=125&selected_disease_name_hidden=Varroosis+of+honey+bees+%28-+%29&disease_type=0&disease_id_terrestrial=125&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2019&selected_report_period=1&selected_start_month=1> (5 December 2019).
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., L., S.G. & Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, E.S. and H.W. (2017) vegan: Community Ecology Package. <<https://cran.r-project.org/package=vegan>>.
- Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., Dubois, E., Tordo, N., Thiéry, R., Houlgatte, R. & Ribière, M. (2008) Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Research*, **132**, 59–68.
- Pacini, A., Mira, A., Molineri, A., Giacobino, A., Bulacio Cagnolo, N., Aignasse, A., Zago, L., Izaguirre, M., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Pietronave, H., Russo, R., Scannapieco, A., Lanzavecchia, S., Schnittger, L. & Signorini, M. (2016) Distribution and prevalence of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, **141**, 34–37.
- Pankiw, T., Page Jr, R.E. & Kim Fondrk, M. (1998) Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **44**, 193–198.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.L. & Alaux, C. (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, **8**, 1–13.
- Paxton, R. (2010) Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*, **49**, 80.
- 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.
- Peng, Y.-S., Fang, Y., Xu, S. & Ge, L. (1987) The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, **49**, 54–60.
- 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 research*, **29**, e45.
- Porrini, M.P., Sarlo, E.G., Medici, S.K., Garrido, P.M., Porrini, D.P., Damiani, N. & Eguaras, M.J. (2011) *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *Journal of Apicultural Research*, **50**, 35–41.
- Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P. & Settele, J. (2010a) Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, **49**, 15–22.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. & Kunin, W.E. (2010b) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 345–353.
- Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V.L., Ngo, H.T., Biesmeijer, J.C., Breeze, T.D., Dicks, L. V., Garibaldi, L.A., Hill, R., Settele, J., Vanbergen, A.J., Aizen, M.A., Cunningham, S.A., Eardley, C., Freitas, B.M., Gallai, N., Kevan, P.G., Kovács-Hostyánszki, A., Kwapong, P.K., Li, J., Li, X., Martins, D.J., Nates-Parra, G., Pettis, J.S. & R. Rader, and B.F.V. (2016) *Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production*. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany.
- Powell, E., Ratnayeke, N. & Moran, N.A. (2016) Strain diversity and host specificity in a specialized gut symbiont of honeybees and bumblebees. *Molecular ecology*, **25**, 4461–4471.
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K. & Moran, N.A. (2014) Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 7378–7387.
- R Studio Team. (2016) *RStudio: Integrated development for R*. P. in.: Boston, MA.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D. & Van Engelsdorp, D. (2019) *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 1792–1801.
- Raymann, K. & Moran, N.A. (2018) The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, 1–8.
- Reinhard, A., Janke, M., von der Ohe, W., Kempf, M., Theuring, C., Hartmann, T., Schreier, P. & Beuerle, T. (2009) Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, **35**, 1086–1095.
- Remnant, E.J., Shi, M., Buchmann, G., Blacquièrre, T., Holmes, E.C., Beekman, M. & Ashe, A. (2017) A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *Journal of Virology*, **91**. American Society for Microbiology.

- Requier, F., Antunez, K., Morales, C., Aldea, P., Castilhos, D., Garrido, P.M., Giacobino, A., Reynaldi, F., Rosso Londono, J.M., Santos, E. & Garibaldi, L. (2018) Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*, **57**.
- Ribderer, T.E. & Rothenbuhler, W.C. (1976) Characteristic field symptoms comprising honeybee haitless black syndrome induced in the laboratory by a virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, **27**, 215–219.
- Ribière, M., Lallemand, P., Iscache, A.L., Schurr, F., Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V. & Faucon, J.P. (2007) Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 7711–7716.
- Ribière, M., Ball, B. & Aubert, M. (2008) *Virology and the honey bee*. P. in.: EEC Publications, Luxembourg.
- Rickli, M., Diehl, P.A. & Guerin, P.M. (1994) Cuticle alkanes of honeybee larvae mediate arrestment of bee parasite *Varroa jacobsoni*. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2437–2453.
- Robinson, G.E. (1992) Regulation of Division of Labor in Insect Societies. *Annual Review of Entomology*, **37**, 637–665.
- Rodríguez, M., Vargas, M., Gerding, M., Navarro, H. & Antúnez, K. (2012) Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *Journal of Apicultural Research*, **51**, 285–287.
- Rodríguez-García, C., Evans, J.D., Branchiccela, B., Li, J.H., Heerman, M.C., Banmeke, O., Zhao, Y., Hamilton, M., Higes, M., Martín-Hernández, R. & Chen, Y. (2018) Nosemosis control in European honey bees *Apis mellifera* by silencing the gene encoding *Nosema ceranae* polar tube protein 3. *Journal of Experimental Biology*, **221**, jeb.184606.
- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P. & Touffet-Briens, F. (2005) Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, **36**, 71–83.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, 596–5119.
- Rotjan, R.D., Calderone, N.W. & Seeley, T.D. (2002) How a honey bee colony mustered additional labor for the task of pollen foraging. *Apidologie*, **33**, 367–373.
- Roulston, T.H. & Cane, J.H. (2000) Pollen nutritional content and digestibility for animals. Pp. 187–209 in: *Pollen and Pollination*. Springer Vienna, Vienna.
- Ruttner, F. (1988) *Biogeography and taxonomy of honeybees*. P. in.: Springer-Verlag, 284 pp.
- Sadd, B.M., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R. & Schmid-Hempel, P. (2005) Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology letters*, **1**, 386–8.
- Saffari, A., Kevan, P.G. & Atkinson, J.L. (2010) Palatability and consumption of patty-formulated pollen and pollen substitutes and their effects on honeybee colony performance. *Journal of Apicultural Science*, **54**, 63–71.
- Salmela, H., Amdam, G. V. & Freitak, D. (2015) Transfer of immunity from mother to

- offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLOS Pathogens*, **11**, e1005015.
- Sammataro, D. & Weiss, M. (2013) Comparison of productivity of colonies of honey bees, *Apis mellifera*, supplemented with sucrose or high fructose corn syrup. *Journal of Insect Science*, **13**, 1–13.
- Santos, E., Mendoza, Y., Díaz, R., Harriet, J. & Campá, J. (2009) Valor económico de la polinización realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación. *Serie de difusión INIA*, **568**, 25–28.
- Santos, M.A.D., Guidugli-Lazzarini, K.R., Do Nascimento Mendes, A., Simões, Z.L.P. & Hartfelder, K. (2008) RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften*, **95**, 953–961.
- Schmehl, D.R., Teal, P.E.A., Frazier, J.L. & Grozinger, C.M. (2014) Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, **71**, 177–190.
- Schmickl, T. & Crailsheim, K. (2004) Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. *Apidologie*, **35**, 249–263.
- Schmitzová, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J. & Šimúth, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and molecular life sciences*, **54**, 1020–30.
- Schulz, D.J., Sullivan, J.P. & Robinson, G.E. (2002) Juvenile hormone and octopamine in the regulation of division of labor in honey bee colonies. *Hormones and Behavior*, **42**, 222–231.
- Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. & Amdam, G. V. (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 962–967.
- Seeley, T.D. (1995) *The wisdom of the hive: The social physiology of honey bee colonies*. P. in.: Harvard University Press, London.
- Seeley, T.D. & Tarpay, D.R. (2007) Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **274**, 67–72.
- Severson, D.W. & Erickson, E.H. (1984) Honey Bee (Himenoptera: Apidae) Colony Performance in Relation to Supplemental Carbohydrates¹. *Journal of Economic Entomology*, **77**, 1473–1478.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. & Cox-Foster, D. (2005) Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, **86**, 2281–2289.
- Simone-Finstrom, M. & Spivak, M. (2010) Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, **41**, 295–311.
- Simone-Finstrom, M.D. & Spivak, M. (2012) Increased Resin Collection after Parasite Challenge: A Case of Self-Medication in Honey Bees? *PLoS ONE*, **7**, e34601.

- Singh, S., Saini, K. & Jain, K.L. (1999) Quantitative comparison of lipids in some pollens and their phagostimulatory effects in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, **38**, 87–92.
- Smart, M., Pettis, J., Rice, N., Browning, Z. & Spivak, M. (2016a) Linking measures of colony and individual honey bee health to survival among apiaries exposed to varying agricultural land use. *PLoS ONE*, **11**, 10–13.
- Smart, M.D., Pettis, J.S., Euliss, N. & Spivak, M.S. (2016b) Land use in the Northern Great Plains region of the U.S. influences the survival and productivity of honey bee colonies. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **230**, 139–149.
- Smith, K.M., Loh, E.H., Rostal, M.K., Zambrana-Torrel, C.M., Mendiola, L. & Daszak, P. (2013) Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. *EcoHealth*, **10**, 434–445.
- Somerville, D.C. (2001) Nutritional value of bee collected pollens. *Rural Industries Research and Development Corporation*, 1–166.
- Somerville, D.C. & Nicol, H.I. (2006) Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **46**, 141–149.
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y., Efrat, H., Levski, S., Kamer, Y., Klinberg, E., Zioni, N., Inbar, S. & Chejanovsky, N. (2011) Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*, **42**, 192–199.
- Starks, P.T., Blackie, C.A. & Thomas D Seeley, P.T. (2000) Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, **87**, 229–231.
- Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., Chauzat, M.P. & vanEngelsdorp, D. (2018) Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science*, **26**, 142–148.
- Steinmann, N., Corona, M., Neumann, P. & Dainat, B. (2015) Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. *Plos One*, **10**, e0129956.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, S.R., Ljubenkovic, J., Radakovic, M. & Aleksic, N. (2011) Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, **42**, 49–58.
- Szathmáry, E. & Smith, J.M. (1995) The major evolutionary transitions. *Nature*, **374**, 227–232.
- Teixeira, E.W., dos Santos, L.G., Sattler, A., Message, D.M., Alves, M.L.T.M.F., Martins, M.F., Grassi-Sella, M.L. & Franco, T.M. (2013) *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **114**, 250–254.
- Toth, A.L. (2005) Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *Journal of Experimental Biology*, **208**, 4641–4649.
- Toth, A.L. & Robinson, G.E. (2005) Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, **69**, 427–435.

- Tritschler, M., Retschnig, G., Yañez, O., Williams, G.R. & Neumann, P. (2017) Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*. *Ecology and Evolution*, **7**, 1850–1857.
- Vandame, R. & Palacio, M.A. (2010) Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? *Apidologie*, **41**, 243–255.
- vanEngelsdorp, D. & Meixner, M.D. (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, 580–595.
- Vaudo, A.D., Patch, H.M., Mortensen, D.A., Tooker, J.F. & Grozinger, C.M. (2016) Macronutrient ratios in pollen shape bumble bee (*Bombus impatiens*) foraging strategies and floral preferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, E4035–E4042.
- Watson, R.R. & Meester, F. De. (2014) *Omega-3 fatty acids in brain and neurological health*. P. in.: Elsevier, Amsterdam, 468 pp.
- Weinstock, G.M., Robinson, G.E., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Weinstock, G.M., Robinson, G.E., Worley, K.C., Evans, J.D., Maleszka, R., Robertson, H.M., Weaver, D.B., Beye, M., Bork, P., Elsik, C.G., Evans, J.D., Hartfelder, K., Hunt, G.J., Robertson, H.M., Robinson, G.E., Maleszka, R., Weinstock, G.M., Worley, K.C., Zdobnov, E.M., Hartfelder, K., Amdam, G. V., Bitondi, M.M.G., Collins, A.M., Cristino, A.S., Evans, J.D., Michael, H., Lattorff, G., Lobo, C.H., Moritz, R.F.A., Nunes, F.M.F., Page, R.E., Simões, Z.L.P., Wheeler, D., Carninci, P., Fukuda, S., Hayashizaki, Y., Kai, C., Kawai, J., Sakazume, N., Sasaki, D., Tagami, M., Maleszka, R., Amdam, G. V., Albert, S., Baggerman, G., Beggs, K.T., Bloch, G., Cazzamali, G., Cohen, M., Drapeau, M.D., Eisenhardt, D., Emore, C., Ewing, M.A., Fahrbach, S.E., Forêt, S., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Hauser, F., Hummon, A.B., Hunt, G.J., Huybrechts, J., Jones, A.K., Kadowaki, T., Kaplan, N., Kucharski, R., Leboulle, G., Linial, M., Littleton, J.T., Mercer, A.R., Page, R.E., Robertson, H.M., Robinson, G.E., Richmond, T.A., RodriguezZas, S.L., Rubin, E.B., Sattelle, D.B., Schlipalius, D., Schoofs, L., Shemesh, Y., Sweedler, J. V., Velarde, R., Verleyen, P., Vierstraete, E., Williamson, M.R., Beye, M., Ament, S.A., Brown, S.J., Corona, M., Dearden, P.K., Dunn, W.A., Elekonich, M.M., Elsik, C.G., Forêt, S., Fujiyuki, T., Gattermeier, I., et al. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, **443**, 931–949.
- Wheeler, D.E. & Kawooya, J.K. (1990) Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **14**, 253–267.
- Wheeler, M.M. & Robinson, G.E. (2014) Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Scientific reports*, **4**, 5726.
- Wheeler, W.M. (1919) The phoresy of Antherophagus. *Psyche*, **26**, 145–152.
- White, J.A., Hart, R.J. & Fry, J.C. (1986) An evaluation of the Water Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, **8**, 170–177.
- White, J.W., Subers, M.H. & Schepartz, A.I. (1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section*

- on *Enzymological Subjects*, **73**, 57–70. Elsevier.
- Williams, G., Shutler, D., LittleKaren, C., Burgher-MacLellan, K. & Rogers, R. (2011) The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B®, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie*, **42**, 15–22.
- Wilson, E.O. (1971) *The insect societies*. P. in: *The Insect Societies*. Cambridge, Massachusetts, USA, Harvard University Press [Distributed by Oxford University Press.
- Yang, X. & Cox-Foster, D. (2007) Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*, **134**, 405–412.
- Zarchin, S., Dag, A., Salomon, M., Hendriksma, H.P. & Shafir, S. (2017) Honey bees dance faster for pollen that complements colony essential fatty acid deficiency. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **71**, 1–11. Behavioral Ecology and Sociobiology.
- Zheng, H., Nishida, A., Kwong, W.K., Koch, H., Engel, P., Steele, M.I. & Moran, N.A. (2016) Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio*, **7**.
- Zheng, H., Powell, J.E., Steele, M.I., Dietrich, C. & Moran, N.A. (2017) Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 4775–4780.
- Zheng, H., Perreau, J., Powell, J.E., Han, B., Zhang, Z., Kwong, W.K., Tringe, S.G., Moran, N.A., Health, H., Engineering, N. & Creek, W. (2019) Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**, 25909–25916.

11. APÉNDICE 1

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados en esta tesis.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Gen de interés	Tamaño del producto esperado	Referencia
ABPV-F	ACCGACAAAGGGTATGATGC	Proteína de la cápside viral del ABPV	124 pb	Johnson <i>et al.</i> , 2009
ABPV-R	CTTGAGTTTGCGGTGTTCT			
BQCV-F	AAGGGTGTGGATTCGTCAG	Poliproteína estructural del BQCV	305 pb	Kukielka <i>et al.</i> , (2008)
BQCV-R	GGCGTACCGATAAAGATGGA			
DWV1-F	ACCGACAAAGGGTATGATGC	Poliproteína del DWV	260 pb	Kukielka <i>et al.</i> , (2008)
DWV1-R	CTTGAGTTTGCGGTGTTCT			
SBV-F	GGGTCGAGTGGTACTGGAAA	Poliproteína del SBV	105 pb	Johnson <i>et al.</i> , 2009
SBV-R	ACACAACACTCGTGGGTGAC			
vg-F	AGTCCGACCGACGACGA	Vitelogenina de <i>Apis mellifera</i>	63 pb	Corona <i>et al.</i> , 2007
vg-R	TCCCTCCCACGGAGTCC			
mrjp1-F	TGACCAATGGCATGATAAGATTTT	Proteína mayor 1 de la jalea real de <i>Apis mellifera</i>	98 pb	Corona, comunicación personal
mrjp1-R	GACCACCATCACCGACCT			
mfe-F	CATCTCAGATCTTTCGGCCTA	Metil fernesoato epoxidasa de <i>Apis mellifera</i>	68 pb	Corona, comunicación personal
mfe-R	AGATTTTCAGCTTCTACGGTT			
him-F	CGACGACAAGAAAGAGGATCCAT	Himenoptecina de <i>Apis mellifera</i>	108 pb	Corona, comunicación personal
him-R	CATTCCATTCTTATCGTAGACACGTT			
him2-F	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	Himenoptecina de <i>Apis mellifera</i>	?? Karina	?? Karina
him2-R	GCGTCTCCTGTCATTCCATT			
ppo-F	TAATTGCGAACGGCTATGTAATCGTCT	Profenol oxidasa de <i>Apis mellifera</i>	109 pb	Corona, comunicación personal
ppo-R	ACTGGCAACAAGGGAATCTAATTTCCG			
cyp9-F	GATTATCGCCTATTACTG	citocromo oxidasa P450 de <i>Apis mellifera</i>	100 pb	esta tesis
cyp9-R	GTTCTCCTCCCTCTGAT			

Tabla 1. Lista de cebadores utilizados en esta tesis (continuación).

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Gen de interés	Tamaño del producto esperado	Referencia
pa1-F	GGTGACACCATTATGGAAGCA	Senecionina N oxigenasa de <i>Apis mellifera</i>		esta tesis
pa1-R	CCTGCAAATCGAACATGCTG			
B-act-F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	-actina de <i>Apis mellifera</i>	148 pb	Yang y Cox-Foster, 2005
B-act-R	GACCCACCAATCCATACGGA			
RPS5-F	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	proteína ribosomal S5 de <i>Apis mellifera</i>		Gregorc <i>et al.</i> , 2012
RPS5-R	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA			
218MITOC-F	CGGGGACGATGTGATATGAAAAATATTA	SSUrRNA de <i>N. apis</i>	218 pb	Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007
218MITOC-R	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG			
321APIS-F	GGGGGCATGCTTTGACGTAATATGTA	SSUrRNA de <i>N. ceranae</i>	321 pb	Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007
321 APIS-R	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACATATG			
ppo_act-F	GCGTCCTCATCACGGATAGACA	Activador de la fenol oxidasa de <i>Apis mellifera</i>	97 pb	Corona, comunicación personal
ppo_act-R	AAATCGTATTGCGCGAGCC			
def-F	TGAATTCGAGCCACTTGAGCATT	defensina 1 de <i>Apis mellifera</i>	172 pb	Corona, comunicación personal
def-R	ACAAATACAAACTCCTTTCTCGCAAT			
dorsal-F	TATTATTATATCAGAGCCGACGGAAAGG	dorsal de <i>Apis mellifera</i>	171 pb	Corona, comunicación personal
dorsal-R	TACTCCATTGGCGATGTACGAT			
DWV2-F	GAGATTGAAGCGCATGAACA			Gregorc <i>et al.</i> , 2012
DWV2-R	TGAATTCAGTGTGCCCCATA			
Napis-F	CCATTGCCGATAAGAGAGT	SSUrRNA de <i>N. apis</i>	269 pb	Chen <i>et al.</i> , 2009
Napis-R	CCACCAAAAACTCCCAAGAG			
Ncer1-F	CGGATAAAAAGAGTCCGTTACC	SSUrRNA de <i>N. ceranae</i>	250 pb	Chen <i>et al.</i> , 2009
Ncer1-R	TGAGCAGGGTTCTAGGGAT			
Ncer2-F	TGCTGATGTTATGGCTACAGAAG	proteína 3 del filamento polar de <i>N. ceranae</i>	90 pb	Martín-Hernández, comunicación personal
Ncer2-R	TACAGATTGCGCTGCTTTAA			

Tabla 2. Resumen de los análisis realizados en el Ensayo 1 del Capítulo 3.

	5/3/2015	26/3/2015	10/4/2015	24/4/2015	7/5/2015	Junio	Julio	Agosto	Setiembre
Estimación de la población de abejas adultas	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias				
Porcentaje de proteína corporal de las abejas	10 colmenas por grupo	X	X	X	X				
Estimación de la población de cría	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias				
Calidad de la cría	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias				
Reservas de polen	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias	Todas las colonias				
Diversidad del polen colectado	10 colmenas por grupo	X	X	X	10 colmenas por grupo				
Nivel de infección con <i>Nosema spp.</i>	10 colmenas por grupo	X	X	X	10 colmenas por grupo				
Análisis de <i>Nosema spp.</i>	10 colmenas por grupo	X	X	X	10 colmenas por grupo				
Nivel de infección con virus	Todas las colonias	X	X	X	Todas las colonias				
Nivel de infección con <i>V. destructor</i>	Todas las colonias	X	X	X	X				

12. APÉNDICE 2

Tabla 1. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 1 del capítulo 1. Comparación del nivel de expresión génica y nivel de infección con el DWV de las abejas alimentadas con polen de *Eucalyptus grandis* 1 y de *Baccharis trimera* de abejas recién emergidas, y de 7 y 14 días de edad. KW: Kruskal Wallis; MW: Mann Whitney; RE: abejas recién emergidas; 7d: abejas de 7 días de edad; 14d: abejas de 14 días de edad.

Comparación	<i>vg</i>	<i>mrip1</i>	<i>mfe</i>	<i>him</i>	<i>ppo</i>	DWV
	KW $p \leq 0,001$	ANOVA $p \leq 0,001$	KW $p \leq 0,001$	ANOVA $p \leq 0,001$	ANOVA $p \leq 0,001$	ANOVA $p \leq 0,001$
RE - 7d Jarabe de sacarosa	MW $p=0,15$	Scheffé $p \leq 0,001$	MW $p=0,02$	Scheffé $p=0,21$	Scheffé $p=0,87$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE - 7 d <i>E. grandis</i>	MW $p=0,05$	Scheffé $p=0,97$	MW $p=0,95$	Scheffé $p=0,22$	Scheffé $p=0,51$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE - 7 d <i>B. trimera</i>	MW $p=0,02$	Scheffé $p=0,97$	MW $p=0,62$	Scheffé $p=0,75$	Scheffé $p=0,99$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE - 14d Jarabe de sacarosa	MW $p=0,99$	Scheffé $p=0,003$	MW $p=0,05$	Scheffé $p \leq 0,001$	Scheffé $p=0,86$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE - 14 d <i>E. grandis</i>	MW $p=0,38$	Scheffé $p=0,45$	MW $p=0,07$	Scheffé $p \leq 0,001$	Scheffé $p=0,1$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE - 14 d <i>B. trimera</i>	MW $p=0,12$	Scheffé $p=0,99$	MW $p \leq 0,001$	Scheffé $p=0,01$	Scheffé $p=0,006$	Scheffé $p \leq 0,001$
7d jarabe de sacarosa - <i>E. grandis</i>	MW $p=0,003$	Scheffé $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	Scheffé $p=0,99$	Scheffé $p=0,98$	Scheffé $p=0,96$
7d jarabe de sacarosa - <i>B. trimera</i>	MW $p \leq 0,001$	Scheffé $p \leq 0,001$	MW $p=0,003$	Scheffé $p=0,96$	Scheffé $p=0,89$	Scheffé $p=0,96$
7d <i>E. grandis</i> - <i>B. trimera</i>	MW $p=0,8$	Scheffé $p=0,99$	MW $p=0,69$	Scheffé $p=0,97$	Scheffé $p=0,53$	Scheffé $p=0,55$
7d - 14d Jarabe de sacarosa	MW $p=0,002$	Scheffé $p=0,99$	MW $p=0,87$	Scheffé $p=0,02$	Scheffé $p=0,99$	Scheffé $p=0,99$
7d - 14d <i>E. grandis</i>	MW $p=0,006$	Scheffé $p=0,06$	MW $p=0,004$	Scheffé $p=0,51$	Scheffé $p=0,98$	Scheffé $p=0,99$
7d - 14d <i>B. trimera</i>	MW $p=0,77$	Scheffé $p=0,7$	MW $p \leq 0,001$	Scheffé $p=0,41$	Scheffé $p=0,005$	Scheffé $p=0,99$
14d jarabe de sacarosa - <i>E. grandis</i>	MW $p=0,09$	Scheffé $p=0,38$	MW $p=0,87$	Scheffé $p=0,65$	Scheffé $p=0,76$	Scheffé $p=0,96$
14d jarabe de sacarosa - <i>B. trimera</i>	MW $p=0,38$	Scheffé $p=0,06$	MW $p \leq 0,001$	Scheffé $p=0,32$	Scheffé $p=0,17$	Scheffé $p=0,99$
14d <i>E. grandis</i> - <i>B. trimera</i>	MW $p=0,02$	Scheffé $p=0,94$	MW $p=0,006$	Scheffé $p=0,99$	Scheffé $p=0,96$	Scheffé $p=0,85$

Tabla 2. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 1 del capítulo 1. Asociación según el test de correlación de rangos de Spearman de los niveles de expresión génica de las abejas alimentadas con jarabe, polen de *Eucalyptus grandis* 1 y polen de *Baccharis trimera*.

		vg			mrjpl			mfe			him			ppo		
		Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>
vg	Jarabe	-	-	-	p=0,69; rho=0,12	-	-	p=0,26; rho=0,29	-	-	p≤0,001; rho=0,76	-	-	p=0,79; rho=-0,09	-	-
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	p≤0,001; rho=0,94	-	p=0,03; rho=-0,56	-	-	p=0,01; rho=-0,64	-	-	p=0,22; rho=-0,4	-	-
	<i>B. trimera</i>	-	-	-	-	-	p=0,15; rho=0,44	-	-	p=0,55; rho=-0,17	-	-	p=0,44; rho=-0,23	-	-	p=0,91; rho=0,03
mrjpl	Jarabe	p=0,69; rho=0,12	-	-	-	-	-	p=0,55; rho=-0,19	-	-	p=0,63; rho=0,16	-	-	p=0,29; rho=0,34	-	-
	<i>E. grandis</i>	-	p≤0,001; rho=0,94	-	-	-	-	p=0,15; rho=-0,38	-	-	p=0,005; rho=-0,67	-	-	p=0,74; rho=-0,1	-	-
	<i>B. trimera</i>	-	-	p=0,15; rho=0,44	-	-	-	-	-	p=0,01; rho=-0,66	-	-	p=0,04; rho=-0,58	-	-	p=0,01; rho=-0,67
mfe	Jarabe	p=0,26; rho=0,29	-	-	p=0,55; rho=-0,19	-	-	-	-	-	p=0,88; rho=0,04	-	-	p=0,06; rho=-0,49	-	-
	<i>E. grandis</i>	-	p=0,03; rho=-0,56	-	-	p=0,15; rho=-0,38	-	-	-	-	p=0,69; rho=0,1	-	-	p=0,24; rho=0,34	-	-
	<i>B. trimera</i>	-	-	p=0,55; rho=-0,17	-	-	p=0,01; rho=-0,66	-	-	-	-	p=0,11; rho=0,45	-	-	p≤0,001; rho=0,79	-

Tabla 2. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 1 del capítulo 1. Asociación según el test de correlación de rangos de Spearman de los niveles de expresión génica de las abejas alimentadas con jarabe, polen de *Eucalyptus grandis* 1 y polen de *Baccharis trimera* (continuación).

		<i>vg</i>			<i>mrjpl</i>			<i>mfe</i>			<i>him</i>			<i>ppo</i>		
		Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>	Jarabe	<i>E. grandis</i>	<i>B. trimera</i>
<i>him</i>	Jarabe	p≤0,001; rho=0,76	-	-	p=0,63; rho=0,16	-	-	p=0,88; rho=0,04	-	-	-	-	-	p=0,88; rho=0,04	-	-
	<i>E. grandis</i>	-	p=0,01; rho=-0,64	-	-	p=0,005; rho=-0,67	-	-	p=0,69; rho=0,1	-	-	-	-	p=0,69; rho=0,1	-	-
	<i>B. trimera</i>	-	-	p=0,44; rho=-0,23	-	-	p=0,04; rho=-0,58	-	-	p=0,11; rho=0,45	-	-	-	-	-	p=0,11; rho=0,45
<i>ppo</i>	Jarabe	p=0,79; rho=-0,09	-	-	p=0,29; rho=0,34	-	-	p=0,06; rho=-0,49	-	-	p=0,88; rho=0,04	-	-	-	-	-
	<i>E. grandis</i>	-	p=0,22; rho=-0,4	-	-	p=0,74; rho=-0,1	-	-	p=0,24; rho=0,34	-	-	p=0,69; rho=0,1	-	-	-	-
	<i>B. trimera</i>	-	-	p=0,91; rho=0,03	-	-	p=0,01; rho=-0,67	-	-	p≤0,001; rho=0,79	-	-	p=0,11; rho=0,45	-	-	-

Tabla 3. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 1. Comparación del nivel de expresión génica y nivel de infección con el Virus de alas deformes de las abejas alimentadas con jarabe, polen polifloral 2 y polen de *Eucalyptus grandis* 2 de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae*. Análisis realizados con Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM).

Variable de respuesta	Variable independiente	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	p valor
vg	Polen polifloral 2	5,92	-2,38	≤0,001
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	6,42		≤0,001
	<i>Nosema</i>	3,07		≤0,001
	Tiempo	0,45		0,26
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	-0,40		0,72
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	-0,32		0,78
	Polen polifloral 2*tiempo	-0,44		0,44
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	-0,81		0,17
	<i>Nosema</i> *tiempo	-1,63		0,005
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	0,36		0,66
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	0,56	0,51		
mtjpl	Polen polifloral 2	8,36	-5,16	≤0,001
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	8,79		≤0,001
	<i>Nosema</i>	4,16		≤0,001
	Tiempo	-0,42		0,13
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	-2,98		0,01
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	-2,80		0,02
	Polen polifloral 2*tiempo	0,20		0,59
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,04		0,90
	<i>Nosema</i> *tiempo	-1,73		≤0,001
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	1,16		0,03
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	0,79	0,15		
mfe	Polen polifloral 2	-0,71	0,89	0,08
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	-0,44		0,27
	<i>Nosema</i>	0,13		0,72
	Tiempo	0,14		0,28
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	0,29		0,61
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	0,92		0,09
	Polen polifloral 2*tiempo	0,63		0,002
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,48		0,01
	<i>Nosema</i> *tiempo	-0,07		0,680
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,46		0,10
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,41	0,12		
def	Polen polifloral 2	0,28	1,30	0,55
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	-0,35		0,44
	<i>Nosema</i>	-0,32		0,48
	Tiempo	-0,28		1,00
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	-0,57		0,38
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	-0,17		0,78
	Polen polifloral 2*tiempo	-0,15		0,490
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,25		0,26
	<i>Nosema</i> *tiempo	-0,25		0,260
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	0,54		8,00
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	0,01	0,95		

Tabla 3. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 1. Comparación del nivel de expresión génica y nivel de infección con el Virus de alas deformes de las abejas alimentadas con jarabe, polen polifloral 2 y polen de *Eucalyptus grandis* 2 de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae*. Análisis realizados con Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM) (continuación).

Variable de respuesta	Variable independiente	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	p valor
dorsal	Polen polifloral 2	-0,34	0,67	0,10
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	-0,70		≤0,001
	<i>Nosema</i>	-0,01		0,93
	Tiempo	0,09		0,16
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	0,29		0,32
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	0,21		0,48
	Polen polifloral 2*tiempo	0,11		0,280
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,15		0,11
	<i>Nosema</i> *tiempo	-0,05		0,55
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,09		0,52
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,04	0,74		
him	Polen polifloral 2	-0,19	-0,01	0,29
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	-0,35		0,04
	<i>Nosema</i>	-0,33		0,06
	Tiempo	0,10		0,10
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	0,14		0,57
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	0,24		0,33
	Polen polifloral 2*tiempo	0,01		0,91
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,09		0,32
	<i>Nosema</i> *tiempo	0,21		0,02
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,09		0,49
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,20	0,11		
ppo_act	Polen polifloral 2	-0,36	0,10	0,30
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	-0,65		0,07
	<i>Nosema</i>	1,70		≤0,001
	Tiempo	0,01		0,94
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	0,06		0,90
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	-0,47		0,38
	Polen polifloral 2*tiempo	0,35		0,02
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,49		0,00
	<i>Nosema</i> *tiempo	-0,87		≤0,001
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,04		0,85
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	0,13	0,56		
ppo	Polen polifloral 2	0,73	-0,25	0,002
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	0,41		0,09
	<i>Nosema</i>	-0,31		0,21
	Tiempo	0,05		0,53
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	0,86		0,01
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	0,77		0,04
	Polen polifloral 2*tiempo	-0,27		0,04
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	-0,08		0,51
	<i>Nosema</i> *tiempo	-0,06		0,61
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,36		0,06
Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,18	0,35		

Tabla 3. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 1. Comparación del nivel de expresión génica y nivel de infección con el Virus de alas deformes de las abejas alimentadas con jarabe, polen polifloral 2 y polen de *Eucalyptus grandis* 2 de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae*. Análisis realizados con Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM) (continuación).

Variable de respuesta	Variable independiente	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	p valor
DWV	Polen polifloral 2	-0,28	2,25	0,460
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	-0,39		0,27
	<i>Nosema</i>	-1,23		≤0,001
	Tiempo	-0,07		0,55
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i>	0,33		0,52
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i>	1,02		0,04
	Polen polifloral 2*tiempo	0,07		0,67
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,11		0,52
	<i>Nosema</i> *tiempo	-0,11		0,50
	Polen polifloral 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,08		0,72
	Polen de <i>E. grandis</i> 2* <i>Nosema</i> *tiempo	-0,31		0,20
<i>N. ceranae</i>	Polen polifloral 2	-1,81	6,83	0,54
	Polen de <i>E. grandis</i> 2	-0,96		0,74
	Tiempo	-0,01		0,97
	Polen polifloral 2*tiempo	1,05		0,03
	Polen de <i>E. grandis</i> 2*tiempo	0,94		0,06

Tabla 4. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 1. Comparaciones pareadas del nivel de expresión génica y nivel de infección con el DWV y con *Nosema ceranae* de las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa, polen polifloral 2 y polen de *Eucalyptus grandis* 2 de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae* de 5 días de edad (tiempo 1). KW: Kruskal Wallis; MW: Mann Whitney.

Comparación	<i>vg</i>	<i>mrip1</i>	<i>mfe</i>	<i>def</i>	<i>dor</i>	<i>him</i>	<i>ppo_act</i>	<i>ppo</i>	DWV	<i>N. ceranae</i>
Tiempo 1	KW $p \leq 0,001$	KW $p \leq 0,001$	KW $p \leq 0,001$	KW $p = 0,02$	KW $p \leq 0,001$	KW $p = 0,002$	KW $p \leq 0,001$	KW $p \leq 0,001$	KW $p = 0,1$	KW $p \leq 0,001$
jarabe - polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,01$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,006$	MW $p = 0,88$	MW $p = 0,005$	-	-
jarabe - polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,08$	MW $p = 0,11$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,003$	MW $p = 0,07$	MW $p = 0,05$	-	-
polen polifloral 2 - polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,48$	MW $p = 0,92$	MW $p = 0,29$	MW $p = 0,67$	MW $p = 0,19$	MW $p = 0,74$	MW $p = 0,09$	MW $p = 0,33$	-	-
N. ceranae y jarabe - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,05$	MW $p = 0,86$	MW $p = 0,06$	MW $p = 0,17$	MW $p = 0,73$	MW $p \leq 0,001$	-	MW $p \leq 0,001$
N. ceranae y jarabe - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,16$	MW $p = 0,31$	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,09$	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,02$	-	MW $p = 0,03$
N. ceranae y polen polifloral 2 - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,47$	MW $p = 0,6$	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,22$	MW $p = 0,05$	MW $p = 0,97$	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,01$	-	MW $p = 0,06$
jarabe - N. ceranae y jarabe	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,91$	MW $p = 0,88$	MW $p = 0,45$	MW $p = 0,01$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,05$	-	-
polen polifloral 2 - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,18$	MW $p = 0,08$	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,19$	MW $p = 0,92$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,97$	-	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,21$	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,03$	MW $p = 0,45$	MW $p = 0,92$	MW $p = 0,44$	MW $p = 0,17$	-	-
jarabe - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,07$	MW $p = 0,75$	MW $p = 0,17$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,004$	MW $p \leq 0,001$	-	-
jarabe - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,15$	MW $p = 0,73$	MW $p = 0,005$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,65$	MW $p = 0,77$	-	-
polen polifloral 2 - N. ceranae y jarabe	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,01$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,07$	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	-	-
polen polifloral 2 - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,05$	MW $p = 0,09$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,002$	MW $p = 0,31$	MW $p = 0,86$	MW $p = 0,67$	MW $p = 0,02$	-	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - N. ceranae y jarabe	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,11$	MW $p = 0,17$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,19$	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	-	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,36$	MW $p = 0,92$	MW $p = 0,21$	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,59$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,45$	-	-

Tabla 5. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 1. Comparaciones pareadas del nivel de expresión génica y nivel de infección con el DWV y con *Nosema ceranae* de las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa, polen polifloral 2 y polen de *Eucalyptus grandis* 2 de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae* de 10 días de edad (tiempo 2). KW: Kruskal Wallis; MW: Mann Whitney.

Comparación	<i>vg</i>	<i>mrip1</i>	<i>mfe</i>	<i>def</i>	<i>dor</i>	<i>him</i>	<i>ppo_act</i>	<i>ppo</i>	DWV	<i>N. ceranae</i>
Tiempo 2	KW $p \leq 0,001$	KW $p \leq 0,001$	KW $p = 0,002$	KW $p \leq 0,001$	KW $p = 0,01$	KW $p = 0,003$	KW $p = 0,06$	KW $p \leq 0,001$	KW $p \leq 0,001$	KW $p \leq 0,001$
jarabe - polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,83$	MW $p = 0,1$	MW $p = 0,19$	-	MW $p = 0,31$	MW $p = 0,01$	-
jarabe - polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,4$	MW $p = 0,03$	MW $p = 0,05$	-	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,53$	-
polen polifloral 2 - polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,67$	MW $p = 0,88$	MW $p = 0,58$	MW $p = 0,52$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,15$	-	MW $p = 0,93$	MW $p = 0,78$	-
N. ceranae y jarabe - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,41$	MW $p = 0,003$	MW $p = 0,65$	MW $p = 0,1$	-	MW $p = 0,005$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,88$
N. ceranae y jarabe - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,41$	MW $p = 0,74$	MW $p = 0,75$	MW $p \leq 0,001$	-	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,02$
N. ceranae y polen polifloral 2 - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,36$	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,39$	MW $p = 0,003$	MW $p = 0,43$	MW $p = 0,29$	-	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,02$
jarabe - N. ceranae y jarabe	MW $p = 0,05$	MW $p = 0,02$	MW $p = 0,44$	MW $p = 0,03$	MW $p = 0,14$	MW $p = 0,48$	-	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	-
polen polifloral 2 - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p = 0,11$	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,002$	MW $p = 0,73$	MW $p = 0,09$	MW $p = 0,22$	-	MW $p = 0,24$	MW $p \leq 0,001$	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,09$	MW $p = 0,65$	MW $p = 0,1$	MW $p = 0,008$	MW $p = 0,69$	MW $p = 0,27$	-	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,34$	-
jarabe - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,46$	MW $p = 0,54$	MW $p = 0,6$	MW $p = 0,15$	-	MW $p = 0,62$	MW $p \leq 0,001$	-
jarabe - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,65$	MW $p = 0,05$	MW $p = 0,002$	MW $p \leq 0,001$	-	MW $p = 0,003$	MW $p \leq 0,001$	-
polen polifloral 2 - N. ceranae y jarabe	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,25$	-	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	-			
polen polifloral 2 - N. ceranae y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,14$	MW $p = 0,01$	MW $p = 0,002$	$p = 0,007$	MW $p \leq 0,001$	-	MW $p = 0,01$	MW $p \leq 0,001$	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - N. ceranae y jarabe	MW $p \leq 0,001$	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,04$	MW $p = 0,007$	$p = 0,35$	MW $p = 0,02$	-	MW $p \leq 0,001$	MW $p = 0,03$	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - N. ceranae y polen polifloral 2	MW $p = 0,37$	MW $p = 0,06$	MW $p = 0,06$	MW $p = 0,99$	$p = 0,17$	MW $p = 0,69$	-	MW $p = 0,37$	MW $p = 0,2$	-

Tabla 6. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 1. Comparaciones pareadas del nivel de expresión génica y nivel de infección con el DWV y con *Nosema ceranae* de las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa, polen polifloral 2 y polen de *Eucalyptus grandis* 2 de abejas sanas e infectadas con *Nosema ceranae* de 15 días de edad (tiempo 3). KW: Kruskal Wallis; MW: Mann Whitney.

Comparación	<i>vg</i>	<i>mrip1</i>	<i>mfe</i>	<i>def</i>	<i>dor</i>	<i>him</i>	<i>ppo_act</i>	<i>ppo</i>	DWV	<i>N. ceranae</i>
Tiempo 3	KW p≤0,001	KW p≤0,001	KW p≤0,001	KW p≤0,001	KW p=0,04	KW p=0,07	KW p≤0,001	KW p≤0,001	KW p≤0,001	KW p≤0,001
jarabe - polen polifloral 2	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,05	MW p=0,4	MW p=0,07	-	MW p=0,01	MW p=0,6	MW p=0,71	-
jarabe - polen de <i>E. grandis</i> 2	MW p=0,003	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,007	MW p=0,05	-	MW p=0,008	MW p=0,21	MW p=0,69	-
polen polifloral 2 - polen de <i>E. grandis</i> 2	MW p=0,44	MW p=0,38	MW p=0,4	MW p=0,09	MW p=0,69	-	MW p=0,88	MW p=0,13	MW p=0,92	-
<i>N. ceranae</i> y jarabe - <i>N. ceranae</i> y polen polifloral 2	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,97	MW p=0,07	MW p=0,44	-	MW p=0,004	MW p=0,88	MW p=0,02	MW p≤0,001
<i>N. ceranae</i> y jarabe - <i>N. ceranae</i> y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,25	MW p=0,28	MW p=0,04	-	MW p≤0,001	MW p=0,03	MW p=0,49	MW p≤0,001
<i>N. ceranae</i> y polen polifloral 2 - <i>N. ceranae</i> y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW p=0,84	MW p=0,34	MW p=0,31	MW p=0,34	MW p=0,19	-	MW p=0,93	MW p=0,06	MW p=0,49	MW p=0,06
jarabe - <i>N. ceranae</i> y jarabe	MW p=0,002	MW p=0,07	MW p=0,47	MW p=0,29	MW p=0,08	-	MW p=0,02	MW p≤0,001	MW p≤0,001	-
polen polifloral 2 - <i>N. ceranae</i> y polen polifloral 2	MW p=0,16	MW p=0,16	MW p=0,02	MW p=0,79	MW p=0,59	-	MW p≤0,001	MW p=0,003	MW p≤0,001	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - <i>N. ceranae</i> y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW p=0,56	MW p=0,51	MW p=0,46	MW p≤0,001	MW p=0,23	-	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p≤0,001	-
jarabe - <i>N. ceranae</i> y polen polifloral 2	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,52	MW p=0,63	MW p=0,05	-	MW p=0,37	MW p≤0,001	MW p≤0,001	-
jarabe - <i>N. ceranae</i> y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,49	MW p=0,78	MW p=0,004	-	MW p=0,51	MW p=0,005	MW p≤0,001	-
polen polifloral 2 - <i>N. ceranae</i> y jarabe	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,01	MW p=0,008	MW p=0,75	-	MW p≤0,001	MW p=0,18	MW p≤0,001	-
polen polifloral 2 - <i>N. ceranae</i> y polen de <i>E. grandis</i> 2	MW p=0,08	MW p=0,03	MW p=0,8	MW p=0,03	MW p=0,06	-	MW p≤0,001	MW p=0,14	MW p≤0,001	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - <i>N. ceranae</i> y jarabe	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p=0,74	-	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p≤0,001	-
polen de <i>E. grandis</i> 2 - <i>N. ceranae</i> y polen polifloral 2	MW p=0,88	MW p=0,77	MW p≤0,001	MW p=0,01	MW p=0,97	-	MW p≤0,001	MW p≤0,001	MW p≤0,001	-

Tabla 7. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 1 del capítulo 2. Comparaciones pareadas del nivel de expresión génica y nivel de infección con el DWV de las abejas alimentadas con polen polifloral 1, polen polifloral 1 y acompañadas por abejas nodrizas y con polen polifloral 1 y suplementadas con contenido intestinal. RE: abejas recién emergidas; 4d: abejas de 4 días de edad; 10d: abejas de 10 días de edad. KW: Kruskal Wallis; MW: Mann Whitney.

Comparación	<i>vg</i>	<i>pal</i>	<i>cyp9q2</i>	<i>him</i>	<i>ppo</i>	DWV
	KW $p \leq 0,001$	ANOVA $p = 0,07$	ANOVA $p = 0,81$	ANOVA $p \leq 0,001$	ANOVA $p = 0,01$	ANOVA $p \leq 0,001$
RE - 4d polen polifloral 1	MW $p = 0,56$	-	-	Scheffé $p = 0,01$	Scheffé $p = 0,84$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE - 4 d polen polifloral 1 y nodrizas	MW $p \leq 0,001$	-	-	Scheffé $p \leq 0,001$	Scheffé $p = 0,99$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE - 4 d polen polifloral 1 + contenido intestinal	MW $p = 0,004$	-	-	Scheffé $p \leq 0,001$	Scheffé $p = 0,07$	Scheffé $p \leq 0,001$
RE- 10d polen polifloral 1	MW $p = 0,86$	-	-	Scheffé $p = 0,46$	-	-
RE - 10 polen polifloral 1 + nodrizas	MW $p = 0,14$	-	-	Scheffé $p = 0,90$	-	-
4d polen polifloral 1 - polen polifloral 1 + nodrizas	MW $p \leq 0,001$	-	-	Scheffé $p = 0,23$	Scheffé $p = 0,81$	Scheffé $p = 0,04$
4d polen polifloral 1 - polen polifloral 1 + contenido intestinal	MW $p = 0,002$	-	-	Scheffé $p = 0,34$	Scheffé $p = 0,23$	Scheffé $p = 0,03$
4d polen polifloral 1 + nodrizas - polen polifloral 1 + contenido intestinal	MW $p = 0,01$	-	-	Scheffé $p = 0,99$	Scheffé $p = 0,04$	Scheffé $p = 0,98$
4d - 10d polen polifloral 1	MW $p = 0,90$	-	-	Scheffé $p = 0,50$	-	-
4d - 10d polen polifloral 1 + nodrizas	MW $p = 0,06$	-	-	Scheffé $p \leq 0,001$	-	-
10d polen polifloral 1 - polen polifloral 1 + nodrizas	MW $p = 0,09$	-	-	Scheffé $p = 0,95$	-	-

Tabla 8. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 1 del capítulo 3. Efecto del estrés nutricional (tratamiento M), el tiempo y la interacción de ambos factores en la población de cría, abejas adultas, porcentaje de proteína corporal, diversidad de polen y en el nivel de infección con *Nosema* spp., los virus de la parálisis aguda (ABPV), de las celdas reales negras (BQCV), de las alas deformes (DWV) y de la cría en sacada, y en el nivel de infectación con *Varroa destructor*. Efecto del estrés nutricional, la infección con *Nosema* spp. y la interacción de ambos factores en la población de abejas adultas. Análisis realizados con Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM).

Variable de respuesta	Variable independiente	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	p valor
Población de cría	Tratamiento M	0,02	13,30	0,84
	Tiempo	-0,100		≤0,001
	Tiempo*TratamientoM	-0,080		≤0,001
Población de abejas adultas	Tratamiento M	0,01	10,30	0,91
	Tiempo	-0,01		≤0,001
	Tiempo*TratamientoM	-0,040		≤0,001
Porcentaje de proteína corporal	Tratamiento M	-0,030	3,85	0,47
	Tiempo	0,004		0,66
	Tiempo*TratamientoM	0,020		0,20
Diversidad de polen	Tratamiento M	0,040	1,78	0,07
	Tiempo	-0,030		≤0,001
	Tiempo*TratamientoM	0,0003		0,96
<i>Nosema</i> spp.	Tratamiento M	-0,02	-0,23	0,28
	Tiempo	0,01		≤0,001
	Tiempo*TratamientoM	0,001		0,02
ABPV	Tratamiento M	-0,730	0,76	≤0,001
	Tiempo	-0,003		≤0,001
	Tiempo*TratamientoM	0,0005		0,43
BQCV	Tratamiento M	0,27	0,68	0,15
	Tiempo	0,00		0,51
	Tiempo*TratamientoM	0,00		0,45
DWV	Tratamiento M	-0,53	1,05	≤0,001
	Tiempo	-0,004		≤0,001
	Tiempo*TratamientoM	0,000		0,81
SBV	Tratamiento M	-0,64	1,25	0,03
	Tiempo	0,0010		0,72
	Tiempo*TratamientoM	0,00		0,69
<i>V. destructor</i>	Tratamiento M	0,00	1,60	0,11
	Tiempo	0,0003		≤0,001
	Tiempo*TratamientoM	0,00		≤0,001
Población de abejas adultas	<i>Nosema</i> spp	-0,16	10,13	≤0,001
	Tratamiento M	-0,0300		0,66
	<i>Nosema</i> *TratamientoM	-0,09		≤0,001

Tabla 9. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 1 del capítulo 3. Comparaciones pareadas de los distintos parámetros asociados a la fortaleza y estado sanitario de las colonias pertenecientes a los grupos M y P. KW: Kruskal Wallis; MW: Mann Whitney.

Comparación	Diversidad de polen Índice de diversidad de Shannon	Población de cría	Población de abejas adultas	ABPV	BQCV	DWW	SBV	<i>V. destructor</i> (% de infección)	<i>V. destructor</i> (total de ácaros)	<i>Nosema spp.</i> (proporción de abejas infectadas)	<i>Nosema spp.</i> (número de esporas en pool de abejas)
Muestreo 1. M vs. P	MW p=0.24	MW p=0.57	MW p=0.71	MW p=0.22	MW p=0.32	MW p=0.23	MW p=0.62	MW p=0.31	Test de T p=0.32	Test de T p=0.32	Test de T p=0.94
Muestreo 2. M vs. P	MW p=0.12	MW p=0.05	MW p=0.02	MW p≤0.001	MW p=0.93	MW p=0.81	MW p=0.002	MW p=0.5	Test de T p=0.30	Test de T p=0.35	Test de T p=0.02
Muestreo 3. M vs. P	MW p≤0.001	MW p=0.003	MW p=0.34	MW p≤0.001	MW p≤0.001	MW p≤0.001	MW p=0.79	MW p=0.52	Test de T p=0.42	Test de T p=0.12	Test de T p=0.14
Muestreo 4. M vs. P	MW p=0.002	MW p=0.02	MW p=0.04	MW p≤0.001	MW p=0.01	MW p≤0.001	MW p=0.06	MW p=0.43	Test de T p=0.60	Test de T p=0.004	Test de T p=0.83
Muestreo 5. M vs. P	MW p=0.06	MW p=0.28	MW p=0.02	MW p≤0.001	MW p=0.1	MW p≤0.001	MW p=0.01	MW p=0.6	Test de T p=0.64	Test de T p≤0.001	Test de T p≤0.001
Junio. M vs. P	-	MW p=0.02	MW p=0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
Julio M vs. P	-	MW p=0.007	MW p=0.001	-	-	-	-	-	-	-	-
Agosto M vs. P	-	MW p=0.004	MW p=0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestreo 6. M vs. P	-	MW p=0.28	MW p=0.02	MW p=0.90	MW p=0.41	MW p=0.80	MW p=0.26	-	-	Test de T p=0.91	-
Grupo M. Agosto vs. Muestreo 6	-	MW p=0.06	MW p=0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo M. Muestreo 5 vs. Muestreo 6	-	-	-	MW p=0.003	MW p=0.23	MW p=0.98	MW p=0.60	-	-	Scheffé p≤0.001	-
Grupo P. Agosto vs. Muestreo 6	-	MW p≤0.0001	MW p≤0.001	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo M. Muestreo 5 vs. Muestreo 6	-	-	-	MW p≤0.001	MW p=0.53	MW p≤0.001	MW p=0.01	-	-	Scheffé p≤0.001	-

Tabla 10. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 3. Efecto de la suplementación con polen polifloral durante el invierno en la población de cría y abejas adultas de colmenas que estuvieron sometidas a estrés nutricional. Análisis realizados con Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM).

Variable respuesta	Variable independiente	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	p valor
Población de cría	Tratamiento MT	3,13	2,315	0,42
	Tiempo	1,546		0,02
	Tratamiento MT*Tiempo	-0,507		0,6
Población de abejas adultas	Tratamiento MT	-2,489	8,112	0,38
	Tiempo	0,38		0,44
	Tratamiento MT*Tiempo	0,622		0,37

Tabla 11. Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo 2 del capítulo 3. Comparaciones pareadas de los distintos parámetros asociados a la fortaleza y estado sanitario de las colonias pertenecientes a los grupos M y P. KW: Kruskal Wallis; MW: Mann Whitney.

Comparación	Población de cría	Población de abejas adultas
Mayo. MM vs. MP	MW p=0,8	Test de t, p=0,24
Junio. MM vs. MP	MW p=0,004	Test de t, p=0,40
Julio. MM vs MP	MW p=0,55	Test de t, p=0,01
Agosto. MM vs. MP	MW p=0,006	Test de t, p=0,17
Setiembre. MM vs. MP	MW p=0,21	Test de t, p=0,08