

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**MAL DE RÍO EN ABEJAS MELÍFERAS. SOBREVIVENCIA LARVARIA EN
FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL MIELATO CONSUMIDO.**

“por”

MUTAY LUZARDO, María Fernanda

OLIVERA LADOS, Mariana

ROSSI, Andrés

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos
para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Tecnología de los Alimentos

Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

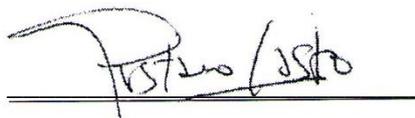
MONTEVIDEO

URUGUAY

2021

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:



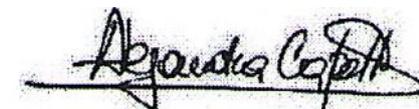
Dr. Gustavo Castro

Segundo miembro (Tutor):



Dr. Enrique Nogueira

Tercer miembro:



Dra. Alejandra Capelli

Cuarto miembro:



Dr. Pablo Juri

Fecha:

16 de noviembre 2021

Autores:



Fernanda Mutay.

Mariana Olivera.

Andrés Rossi.

AGRADECIMIENTOS

Un gran agradecimiento a nuestro Tutor Enrique Nogueira y al Co tutor Pablo Juri, gracias por la buena energía, el apoyo constante y la oportunidad de esta linda experiencia. También a este gran equipo que formamos.

A nuestra Facultad por tanto.

Y otro agradecimiento muy especial a nuestras familias, amigos y todos los que han sido parte de este largo camino.

Gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

| Contenido | Página |
|--|---------------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 3 |
| TABLA DE CONTENIDOS | 4 |
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | 5 |
| RESUMEN | 8 |
| SUMMARY | 9 |
| 1- INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1- La apicultura. Antecedentes históricos. | 10 |
| 1.2- La apicultura en Uruguay | 11 |
| 1.3- Organización, integrantes de la colonia y ciclo biológico | 14 |
| 1.3.1-Ciclo natural de una colonia | 18 |
| 1.4- Importancia de las abejas en la producción de alimentos, mantenimiento de ecosistemas y pérdida de colonias | 19 |
| 1.5- Principales enfermedades infecciosas y trastornos no infecciosos de las abejas en Uruguay. | 20 |
| 1.6- Mal del Río | 21 |
| 2- HIPÓTESIS | 24 |
| 3- OBJETIVOS | 24 |
| 3.1- Objetivos Generales | 24 |
| 3.2- Objetivos Específicos | 24 |
| 4- MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 4.1- Manejo de las colonias | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Fotografía de la cría y análisis de imágenes | 27 |
| 4.3 Análisis estadístico | 30 |
| 5- RESULTADOS | 31 |
| Sobrevivencia larvaria | 31 |
| Tamaño de las larvas | 31 |
| 6- DISCUSIÓN | 33 |
| 7- CONCLUSIONES | 37 |
| 8- BIBLIOGRAFÍA | 38 |

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS:

- Figura 1: Colmena fijistas, rustica de mimbre utilizadas antiguamente.
- Figura 2: Esquema colmena Langstroth, movilista, utilizada actualmente.
- Figura 3: Evolución del número de propietarios y colmenas en Uruguay en el periodo 2010-2019.
- Figura 4: Apiarios de la Declaración Jurada, 2020.
- Figura 5: Gráfica Exportación de miel Uruguay, volumen y principales destinos.
- Figura 6: Castas de abejas adultas: obrera, reina y zángano de izquierda a derecha.
- Figura 7: Etapas del desarrollo de la reina
- Figura 8: Etapas del desarrollo del zángano
- Figura 9: Etapas del desarrollo de la abeja obrera
- Figura 10: Distribución de las diferentes tareas de las abejas obreras dentro y fuera de la colmena
- Figura 11: Tareas de las abejas obreras a lo largo de su vida y forma de distribirse dentro de la colmena.
- Figura 12: Ciclo natural esperable en una colmena en Uruguay.
- Figura 13: Enfermedades de la abeja adulta y de la cría.
- Figura 14: Distribución geográfica en Uruguay de la enfermedad MDR desde 1951 hasta el año 2016.
- Figura 15: *Epormenis cestri*: A) Estadio adulto, B) Ninfa C) Excreciones sobre las hojas
- Figura 16: A) y B) Carpas de tul de 4 x 6 m que fueron utilizadas para que las colonias no puedan traer recursos y deban utilizar lo que se les oferta para alimentarse, C) grupos de acuerdo a las proporciones de miel y mielato tóxico ofertados y D) disposición de los grupos en las carpas.
- Figura 17: Preparación de la carpa y alimento que se les aporto: A) miel/mielato y B) tortas de polen.
- Figura 18: Esquema y foto del bastidor que porta la cámara y el cuadro.
- Figura 19: Grilla que se superpone en la fotografía de los cuadros para contabilizar la sobrevivencia larvaria en un mismo sector día a día. (A y B) Celdas coloreadas que serán contabilizadas (B)
- Figura 20: A) Larva de tamaño normal respecto al día de nacida y B) larva de menor tamaño respecto al día de nacida.
- Figura 21: Curvas de sobrevivencia de colonias que recibieron mielatos provenientes de colonias afectadas por el Mal del Río en diferentes concentraciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) para el test de Tukey.
- Figura 22: Tamaño de las larvas de cinco días en colonias de abejas que recibieron mielatos provenientes de colonias afectadas por el Mal del Río en diferentes concentraciones. Se indican los niveles de significación para el test de Tukey.
- Figura 23: Esquema de como se ve en el panal el ciclo de desarrollo de la abeja A) Normal, donde cada huevo se transforma en una larva que luego es operculada dando un patrón compacto B) la muerte de larvas-(cruces rojas) ocasiona el patrón de cría salteada en la cría operculada, donde se van a alternar celdas operculadas con celdas vacías.

Figura 24: Cuadros de Mal del Río leves, moderados y graves de acuerdo a la sobrevivencia larvaria (patrón de salteo de la cría) B) Concentración de mielatos y sobrevivencia larvaria y como se relacionaría con el patrón de salteo de la cría.

RESUMEN

El Mal del Río es una intoxicación que afecta a las colonias de abejas melíferas y se caracteriza por una mortalidad masiva de larvas que puede determinar la muerte de las colonias por despoblamiento. Esta intoxicación que es producida cuando las abejas colectan las excreciones de un insecto, *Epormenis cestri* que están hospedados en árboles de Sarandí Colorado (*Sebastiana schottiana*), ocurre en apiarios cercanos a cursos de agua con abundante vegetación asociada y los primeros signos clínicos se detectan a finales de la primavera e inicios del verano. El principal signo clínico es la ausencia de larvas, que puede ser total en los casos más graves o parcial en los casos moderados y leves. El objetivo del trabajo fue relacionar la mortalidad larvaria con la concentración del mielato tóxico que consumen las colonias. Se utilizaron 20 colonias sin reservas de alimentos, divididas en 5 grupos a los que se les aportó concentraciones crecientes del mielato tóxico: I) 0%, II) 12,5%, III) 25%, IV) 50% y V) 100%. Se armaron 4 carpas de tul y en cada carpa se instaló una colonia de cada grupo, las que únicamente podían consumir la dieta que se le había ofertado. Durante 9 días se realizó el seguimiento fotográfico en cada colonia del desarrollo de un sector de huevos hasta que las larvas iniciaban el proceso de metamorfosis. A partir del análisis de imágenes se contabilizó la sobrevivencia larvaria de cada grupo día a día y se confeccionaron las curvas de sobrevivencia larvaria, siendo el % de sobrevivencia larvaria final en cada grupo: I) $78 \pm 10,1$, II) $45 \pm 12,7$, III) $9 \pm 11,7$, IV) $1 \pm 0,8$ y V) 0. El análisis de imágenes además permitió detectar que las larvas sobrevivientes en los grupos que consumieron mielato que las tenían en cantidad suficiente (Grupos II y III) fueron menores a las del grupo que no recibió mielato. Se concluye que el mielato produce mortalidad larvaria masiva a muy bajas concentraciones, que los diferentes cuadros clínicos que se ven en condiciones de campo pueden estar relacionados a la cantidad de mielato que las abejas están consumiendo en relación a otros recursos, y dado que las larvas sobrevivientes pueden también estar afectadas, la enfermedad puede ser más grave de lo que se había descripto anteriormente.

SUMMARY

River disease is an intoxication that affects honey bee colonies and is characterized by a massive mortality of larvae that can determine the death of colonies by depopulation. This intoxication, which is produced when bees collect the excretions of an insect *Epormenis cestri* that are hosted in Sarandí Colorado trees (*Sebastiania schottiana*), occurs in apiaries near waterways with abundant associated vegetation and the first clinical signs are detected at late spring and early summer. The main clinical sign is the absence of larvae, which can be total in the most severe cases or partial in moderate and mild cases. The objective of the work was to relate larval mortality with the concentration of toxic honeydew consumed by the colonies. 20 colonies without food reserves were used, divided into 5 groups to which increasing concentrations of toxic honeydew were given: I) 0%, II) 12.5%, III) 25%, IV) 50% and V) 100 %. 4 tulle tents were set up and a colony from each group was installed in each tent, which could only consume the diet that had been offered. Photographic monitoring was carried out for 9 days in each colony of the development of an egg sector until the larvae began the metamorphosis process. From the analysis of images, the larval survival of each group was counted day by day and the larval survival curves were made, with the final larval survival % in each group: I) $78 \pm 10,1$, II) $45 \pm 12,7$, III) $9 \pm 11,7$, IV) $1 \pm 0,8$ and V) 0. The image analysis also made it possible to detect that the surviving larvae in the groups that consumed honeydew that had them in sufficient quantity (Groups II and III) were smaller than those of the group that did not receive honeydew. It is concluded that honeydew produces massive larval mortality at very low concentrations, that the different clinical pictures seen in field conditions may be related to the amount of honeydew that the bees are consuming in relation to other resources, and since the larvae survivors may also be affected, the disease may be more severe than previously described.

1. INTRODUCCIÓN

1.1- La apicultura. Antecedentes históricos

Para referirnos a la apicultura tenemos que remontarnos al origen de la palabra, proveniente del Latín, *apis* que significa abeja y *cultura*, cultivo, (cultivo de las abejas). Según la Real Academia Española, se puede definir como: “el arte de criar abejas para aprovechar sus productos”. Más completo y preciso sería definirla como la ciencia aplicada que estudia la abeja melífera y mediante la tecnología se obtienen beneficios económicos (Negrin, 2009).

La **apicultura** es por lo tanto una actividad agropecuaria con el objetivo de obtener los productos que ellas son capaces de elaborar y posteriormente recolectarlos para el consumo humano. El principal aporte de las abejas es la producción de miel y la polinización de cultivos (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA).

Durante miles de años las colmenas que se explotaban eran rústicas o fijistas, construídas con los recursos existentes en cada región, como arcilla, troncos huecos, paja, mimbre etc., como se hace referencia en la Figura 1., y los panales que las abejas construían eran destruidos total o parcialmente para cosecharlas, además que las revisiones o los manejos que podían aplicarse eran muy limitados (Crane. 1999). Si bien desde hacía décadas en distintos lugares de Europa se estaba intentando desarrollar una colmena que permitiera retirar los cuadros con los panales sin destruirlos, recién a mediados del siglo XIX, en Estados Unidos, Lawrence Langstroth, comprendió el concepto de “espacio de abeja” y desarrolló una colmena movilista (Figura 2) basada en ese concepto, que patentó en 1852. Esto significó el pasaje a la apicultura moderna basada en colmenas de cuadros móviles, y si bien actualmente existen varios modelos de colmenas de cuadros móviles, la colmena Langstroth es la más utilizada a nivel mundial para la apicultura comercial (INTA).



Figura 1: Colmena fijistas, rustica de mimbre utilizadas antiguamente. Fuente: Besora, (2015).

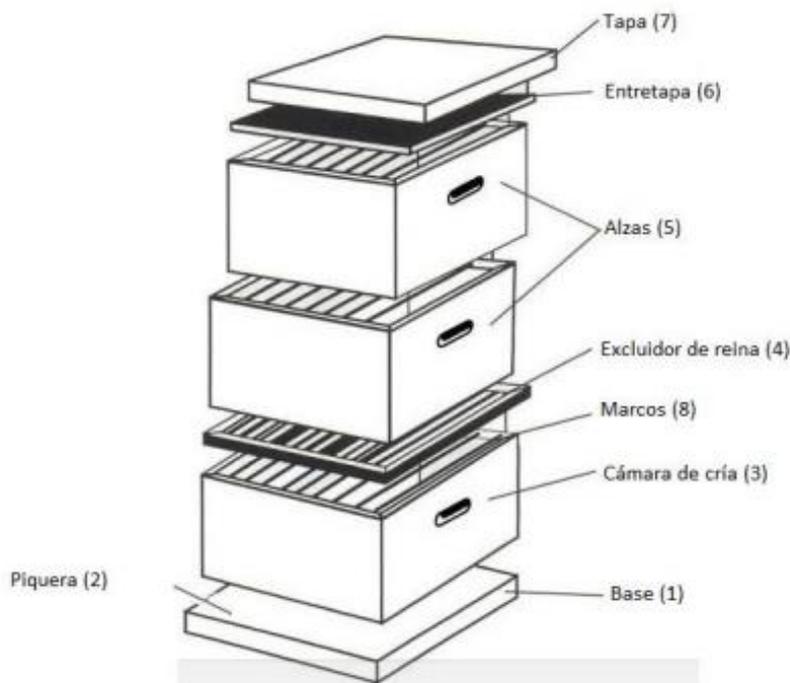


Figura 2: Esquema colmena Langstroth, movilista, utilizada actualmente. Fuente: Besora, (2015).

1.2- La apicultura en Uruguay

Las primeras colonias de abejas fueron introducidas en Uruguay en 1834 por Bernardino Rivadavia por lo que fue uno de los primeros países de Sudamérica en desarrollar la apicultura. En 1855 ya se comercializaba miel en nuestro país, pero solo en droguerías y en 1859 se comienza a comercializar los distintos subproductos como la cera. (Cordara. 2007). En 1892 se introdujo la primera colmena movilista estándar, importada desde los Estados Unidos (Negrin, 2009).

Actualmente Uruguay exporta más del 90% de la miel que produce, contando con más de 560.000 colmenas y casi 2500 propietarios de colmenas o productores en el territorio nacional, este hecho lo convierte en un país netamente exportador en el rubro. La Figura 3 hace referencia al número de propietarios y colmenas en el periodo 2010-2019. (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. 2020). El Sector Apícola en Uruguay ha mantenido un nivel de producción anual de miel en el entorno de las 12.000 toneladas en los últimos 5 años de acuerdo a la información relevada por el Sistema Nacional de Trazabilidad de la Miel y los Productos Apícolas (SINATPA. 2020). La apicultura ha sido en los últimos años el segundo rubro de exportación del sector granjero en Uruguay, solamente detrás de los cítricos (MGAP, 2020).

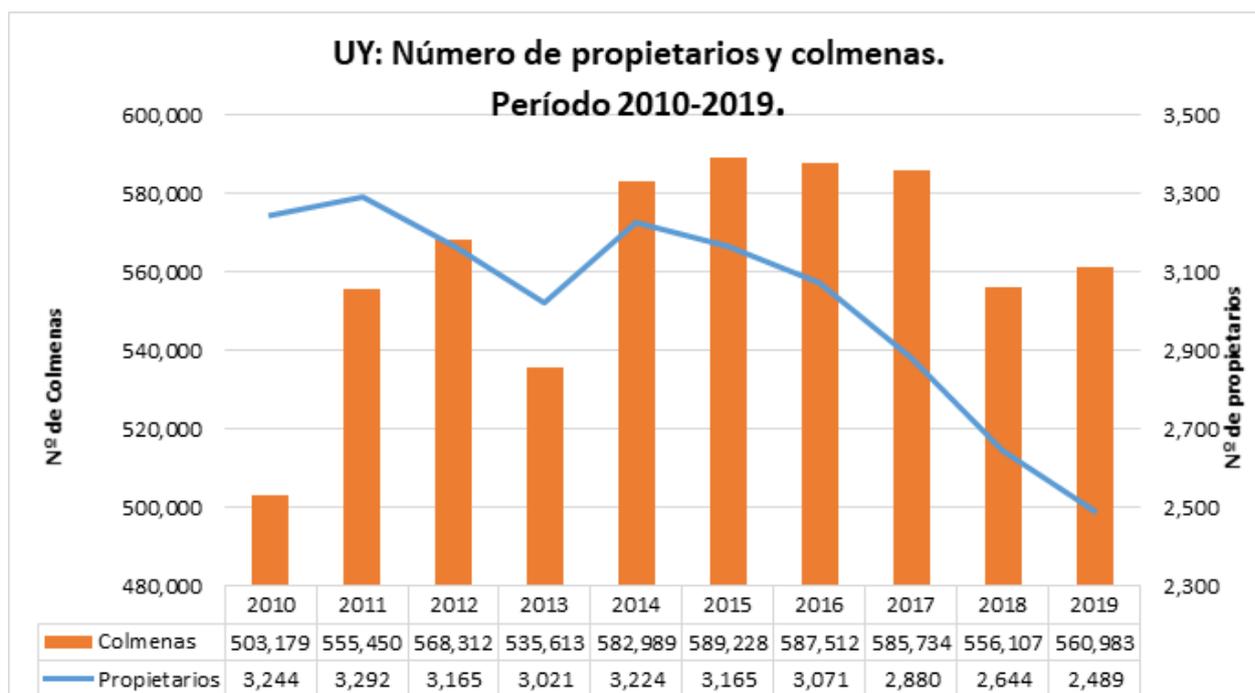


Figura 3: Evolución del número de propietarios y colmenas en Uruguay, periodo 2010-2019.
Fuente: SINATAPA 2020.

Los departamentos con mayor actividad apícola son Rivera, Soriano, Paysandú, Río Negro y Colonia, quienes suman el 49% del total de propietarios de colmenas y el 56% del total de colmenas declaradas (Figura 4).



Figura 4: Apiarios de la Declaración Jurada, 2020. Fuente: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/distribucion-colmenas-uruguay>.

Según el SINATPA la actividad apícola es el tipo de producción extractiva o de servicios que los propietarios de colmenas declaran realizar. Los productos apícolas declarados son: miel, propóleos, cera, polen, apitoxina, jalea real, reinas, núcleos, paquetes, trashumancia y polinización.

Del total de propietarios de colmenas en 2020, el 28% declara realizar una sola actividad (Miel) (Figura 5), mientras que el 71% declara tener más de una actividad asociada a sus colmenas con el común denominador de la producción de miel, siguiendo en orden, los productos de cera (24%) y propóleos (18%).

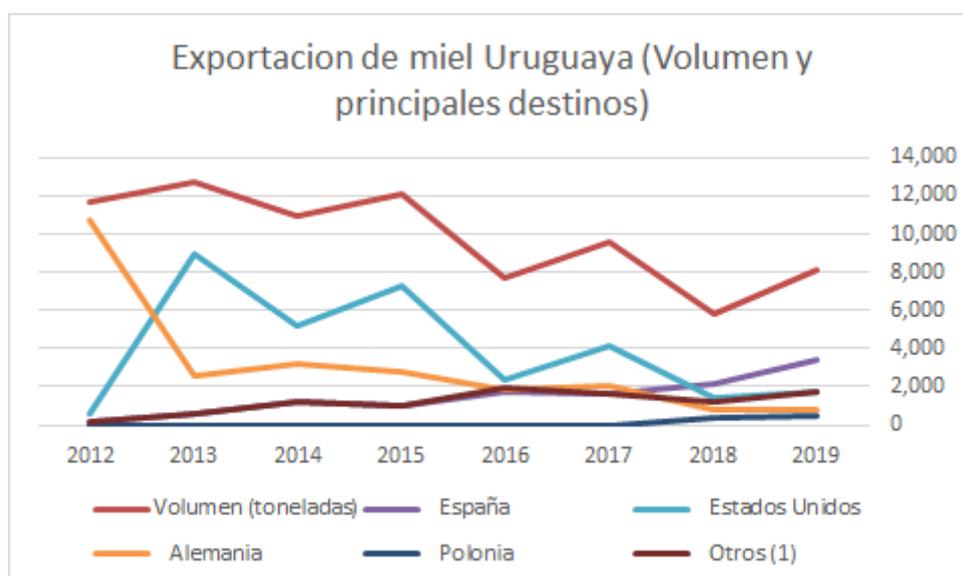


Figura 5: Gráfica Exportación de miel Uruguay, volumen y principales destinos. Fuente: MGAP-DIEA. 2020.

1.3- Organización, integrantes de la colonia y ciclo biológico

Taxonómicamente la abeja pertenece a la Clase: insecta. Familia Apidae, Género *Apis*: que contiene 11 especies conocidas dentro de las cuales se encuentra la *Apis mellifera*. (Crane, 2009).

Las abejas melíferas son insectos eusociales por lo que forman colonias con decenas de miles de individuos. El comportamiento social hace que una colonia funcione como un superorganismo en el que tanto en número de integrantes como las funciones que realizan están perfectamente reguladas y coordinadas. Las interacciones sociales y la regulación de la actividad se realizan gracias a la capacidad de comunicación de sus integrantes (Quero, 2004).

En una colonia de abejas encontramos tres tipos de individuos morfológica y funcionalmente diferenciados que constituyen las **castas**: reina, zánganos y obreras (Figura 6) (Quero, 2004).



Figura 6: Castas de abejas adultas: de izquierda a derecha obrera, reina y zángano.

Fuente: Ramsey, (2018). *The ethology of honeybees (Apis mellifera) studied using accelerometer technology*. Nottingham Trent University (United Kingdom).

Las abejas tienen un proceso de metamorfosis completa y su desarrollo se divide en cuatro fases: huevo, larva, ninfa o pupa y adulta, y la duración de desarrollo completo varía según cada casta, siendo de 16 días para la reina (Figura 7), 21 para la obrera (Figura 8) y 24 días para los zánganos (Figura 9) (Martinez & Ayala, 2017).

Reina: solo hay una por colmena, es la única hembra que se desarrolla sexualmente, y al tener las ovariolas desarrolladas tiene un abdomen más largo y prominente, lo que permite diferenciarla fácilmente de las abejas obreras (Mendizabal. 2005). Las funciones principales de la reina son mantener la cohesión de la colonia mediante las feromonas que produce, y la de poner los huevos que darán origen a los nuevos individuos de la colonia (Yadav, Kumar & Jat, 2017). Las feromonas que produce estimulan la organización de la colmena motivando a las obreras a cumplir sus funciones (Quero. 2004). La reina también controla el sexo de su descendencia, teniendo la posibilidad de poner dos tipos de huevos: haploides (n) sin fecundar de los cuales nacen machos o zánganos, y huevos diploides ($2n$) fecundados, que van a dar origen a hembras diploides ya sea una obrera o una reina. (Yadav *et al.*, 2017; Guiomar. 2011).

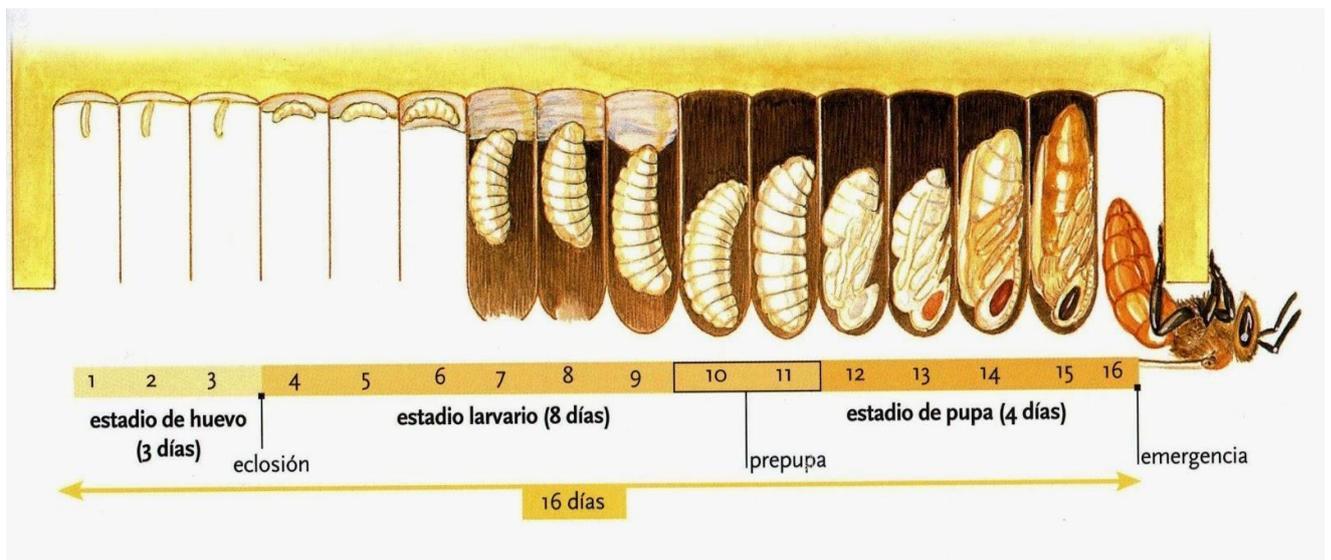


Figura 7: Etapas del desarrollo de la reina. Fuente: Clément, (2012).

Zánganos: Son más largos que las obreras, miden alrededor de 1,5 cm y son más voluminosos que la reina y obreras. Su presencia está limitada a la estación reproductiva, aunque en colonias fuertes en climas templados pueden existir durante todo el año. Su número rara vez supera el de varios cientos. No tienen ninguna de las estructuras necesarias para recoger néctar o polen y carecen del aparato del veneno. Su principal función es la de fecundar a una reina mientras esta se encuentra realizando los vuelos de fecundación (Yadav *et al.*, 2017).

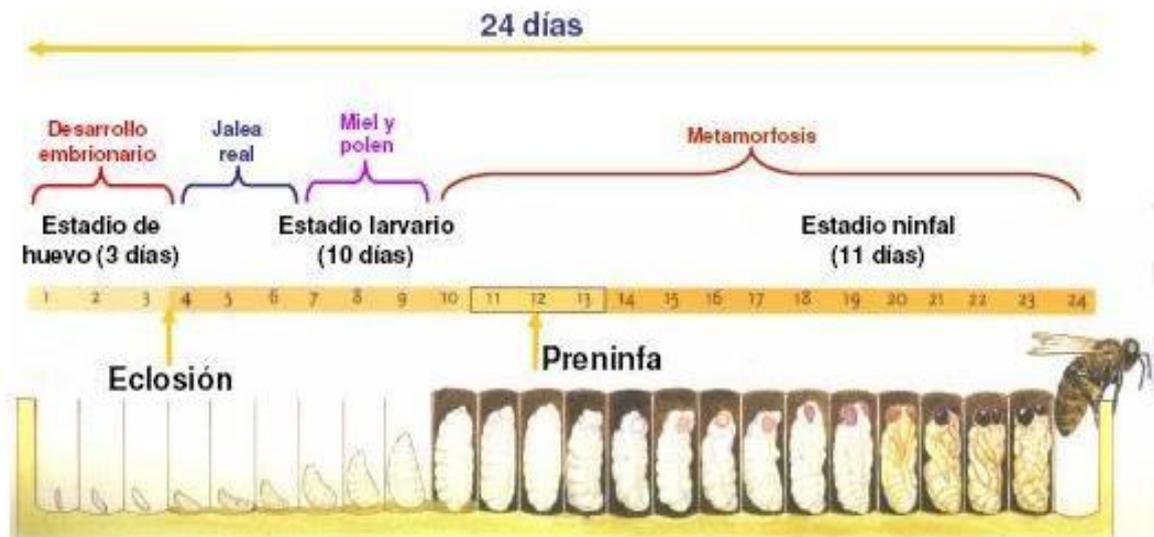


Figura 8: Etapas del desarrollo del zángano. Fuente: Clément, (2012).

Obreras: Las abejas obreras forman la mayor parte de la colonia y su número puede variar desde 4.000 o 5.000 individuos hasta 60.000 o 70.000 dependiendo de la estación del año y fortaleza de la colonia. Son los individuos más pequeños de la colmena, normalmente sus órganos reproductores están atrofiados. Las abejas obreras poseen un aparato del veneno, constituido por una parte glandular, un reservorio y un aguijón, el cual lo utilizan en casos necesarios y por lo general mueren después de usarlo ya que se desprende al utilizarlo (Yadav *et al.*, 2017). El ciclo de la abeja obrera es de 21 días (Figura 10).

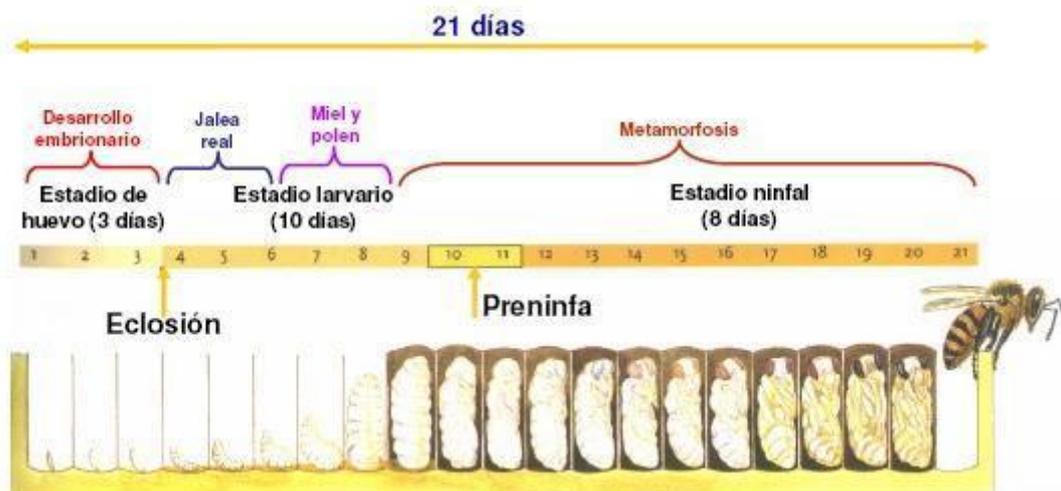


Figura 9: Etapas del desarrollo de la abeja obrera. Fuente: Clément, (2012).

Las obreras son las que a lo largo de su vida se encargan de la mayor cantidad de las tareas de la colonia, las cuales van cambiando según la edad lo que se le denomina politeísmo temporal o programación normal (Figura 10 y Figura 11) (Mortensen, Smith & Ellis. 2015).

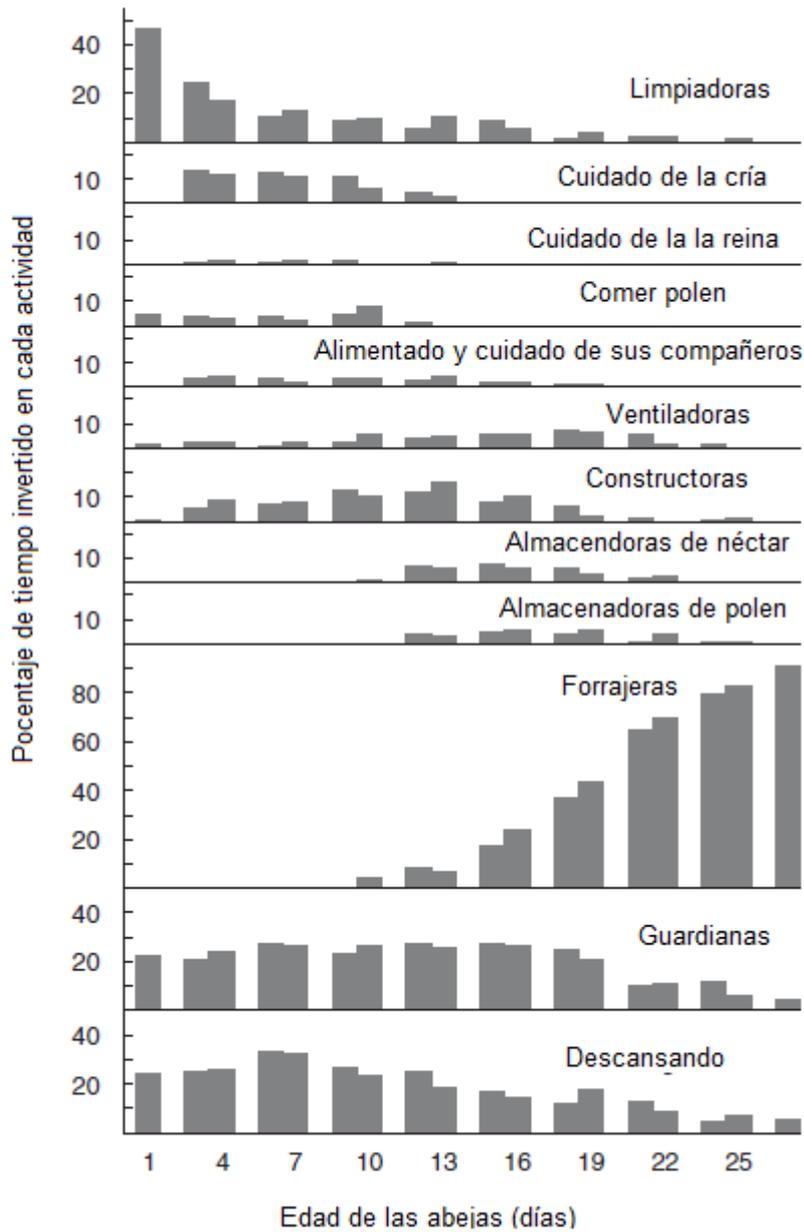


Figura 10: Distribución de las diferentes tareas de las abejas obreras dentro y fuera de la colmena. Seeley, (2009)

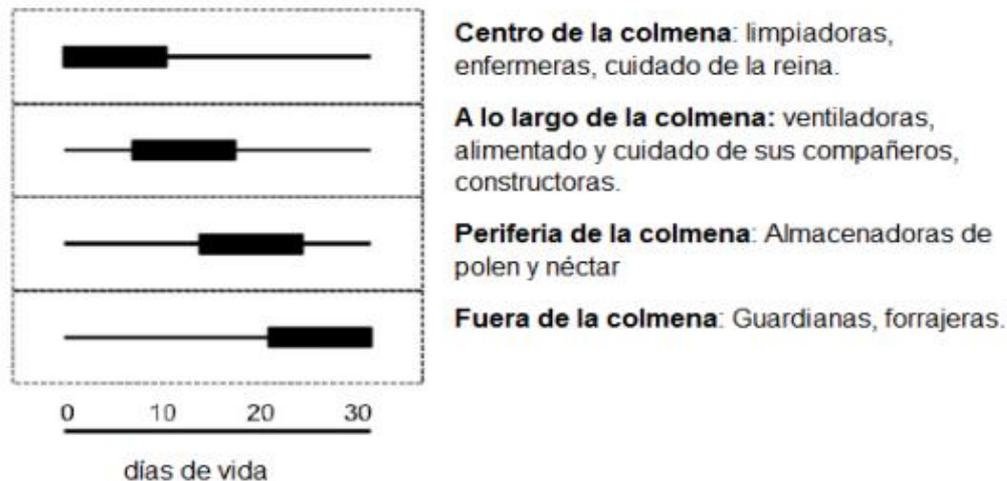


Figura 11: Tareas de las abejas obreras a lo largo de su vida y forma de distribuirse dentro de la colmena. (Mortensen *et al.*, 2015).

La **longevidad** para cada habitante de la colmena es variable, la reina en promedio puede vivir de 3 a 5 años, las obreras 4-6 semanas en el verano y hasta 4 a 5 meses en invierno y los zánganos entre 1,5 a 3 meses apareciendo en verano y desapareciendo en el otoño (Kilani, 1999). Otra diferencia importante es la duración del ciclo de desarrollo de cada uno, ya mencionados anteriormente. En el caso de la reina demora en total 15-16 días, los zánganos 24 días y en las abejas obreras un total de 21 días. (Quero, 2004; Martínez *et al.*, 2017; Yadav *et al.*, 2017).

1.3.1-Ciclo natural de una colonia

El ciclo natural de la colmena es anual y es muy dependiente de la vegetación existente en el entorno donde está la colonia (Figura 12). En las regiones templadas el ciclo comienza en la primavera y se caracteriza por cuatro fases sucesivas: 1- Fase de desarrollo, 2- Fase de enjambre, 3- Fase de preparación para la invernada, 4- Fase de invernada. (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2009).

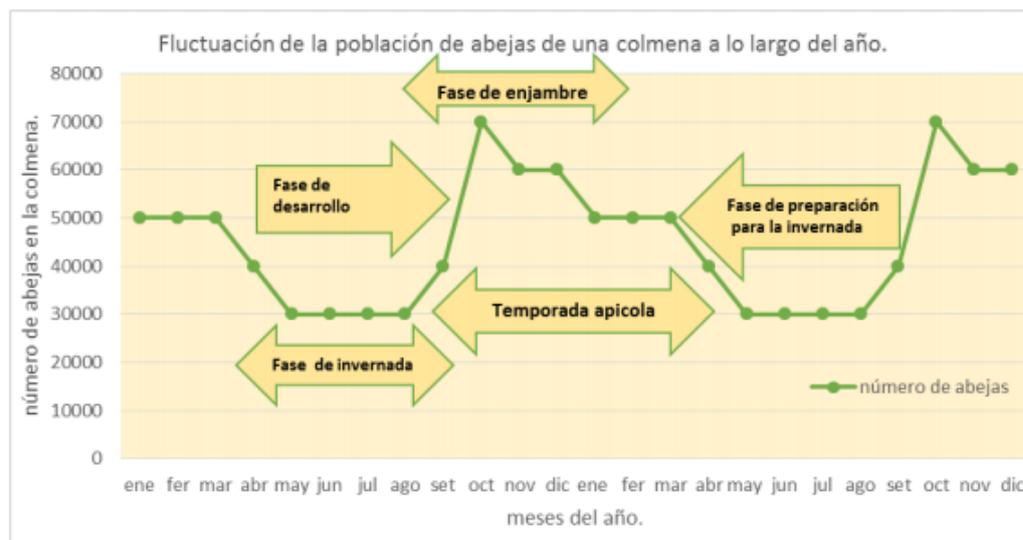


Figura 12: Ciclo natural esperable en una colmena en Uruguay. Fuente: Unidad Académica de Animales de Granja- Facultad de veterinaria - UDELAR

Cada colonia de abejas puede contar con 40.000 a 60.000 individuos durante la estación cálida, con un índice de caída a 15.000 o incluso 5.000 en invierno (AFSSA, 2009), Las abejas necesitan 37°C dentro de la colmena para desarrollar su cría y 17°C cuando no hay cría (Mendizabal, 2005).

1.4- Importancia de las abejas en la producción de alimentos, mantenimiento de ecosistemas y pérdida de colonias

La actividad apícola en base a la domesticación de las abejas melíferas occidentales *Apis mellifera* se practica en todo el mundo con diferente grado de desarrollo (Alippi, 2014) existiendo actualmente 90.999.730 colmenas en explotación en el mundo, con una producción anual de 1.860.712 toneladas de miel (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2021). A la producción de miel se le debe sumar otros productos que se pueden obtener de la explotación apícola, como el propóleo, el veneno de abeja, la cera, el polen, la jalea real, y la producción de material vivo como reinas, paquetes de abejas y núcleos de abejas.

Las abejas melíferas además de generar productos para la alimentación, cosmética y medicina, brindan un servicio de enorme valor ecológico y productivo, como agente polinizador. Aproximadamente el 80 % de todas las especies de plantas que florecen están especializadas para ser polinizadas por animales, principalmente insectos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2008., Altieri *et al.*, 2015).

Gallai, Salles, Settele & Vaissière, (2009) cuantifican en el año 2005 el beneficio económico atribuible a los insectos polinizadores, entre los que se destacan las abejas melíferas, adjudicándole un valor de €153.000.000.000, lo que representó el 9,5% del valor total de la producción agrícola de ese año, aunque la proporción podría ser mucho mayor, ya que solo se consideraron los cultivos más importantes para el consumo humano directo y no incluye la contribución de los polinizadores en la producción de semillas de cultivos, ni las pasturas y cultivos forrajeros, la producción de flores ornamentales, así como tampoco el valor de los polinizadores en el mantenimiento de los ecosistemas silvestres, valores importantes que siguen sin ser calculados. Por otra parte, los cultivos que dependen de los servicios de polinización son de alto valor, alcanzando un promedio de 761 euros por tonelada frente a los 151 euros por tonelada de los cultivos que no dependen de la polinización animal.

Desde hace más de 10 años vienen ocurriendo importantes pérdidas de colonias de abejas en algunas regiones del mundo. En Estados Unidos Pettis & Delaplane, (2010) mencionan que en 1940 existían 6 millones de colonias de abejas, y en 2008 esa cifra se redujo a 2,3 millones. La situación de pérdidas de colonias ha sido estudiada en Latinoamérica (Maggi *et al.*, 2016) y también específicamente en Uruguay (Antúnez *et al.*, 2017). Estas pérdidas de polinizadores están generando una preocupación creciente en la comunidad científica y también en los gobiernos, debido a las consecuencias que puede tener sobre la producción mundial de alimentos (FAO, 2008).

Un estudio reciente indica que la pérdida de polinizadores constituye una de las principales amenazas para el sostenimiento de las poblaciones humanas en las próximas décadas y la importancia de un manejo sustentable para tratar de disminuir estas pérdidas (Chaplin-Kramer *et al.*, 2019).

1.5- Principales enfermedades infecciosas y trastornos no infecciosos de las abejas en Uruguay

Las abejas melíferas, como cualquier otro organismo vivo, son susceptibles a ser afectadas por una gran variedad de enfermedades producidas por bacterias (Allipi, 2014), virus (Ritter, 2014), hongos (Fries, 2014), parásitos (Mondet & Le Conte, 2014), así como plagas y predadores (Ritter & Allsop, 2014; Schäfer & Ritter, 2014), que pueden tener un efecto nocivo en el desarrollo y productividad.

Existen más de 20 enfermedades conocidas de la abeja melífera occidental y solo 6 de estas, están consideradas como de declaración obligatoria dentro del código de los animales terrestres de la OIE: Loque Americana, Loque Europea, Varroasis, Acariosis, infestación por *Tropilaelaps* y *Aethina tumida*. En Uruguay, como en todo país con industrias apícolas desarrolladas, las enfermedades de las abejas son una de las principales causas que afectan la rentabilidad de las empresas apícolas, no habiendo registradas enfermedades zoonóticas en las abejas. (Invernizzi *et al.*, 2011; Anido *et al.*, 2015).

Las enfermedades de las abejas, suelen dividirse como enfermedades de las abejas adultas y enfermedades de la cría (Figura 13), de acuerdo a la etapa en la que se afectan las abejas (Guzmán, 2012).

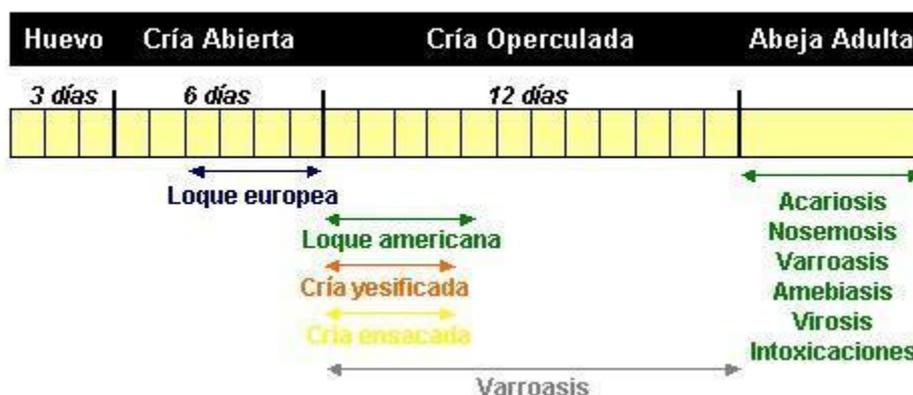


Figura 13: Enfermedades de la abeja adulta y de la cría. Fuente: Julio, (2011).

Además de las enfermedades infecciosas, las abejas están expuestas a una gran variedad de sustancias, que están en el entorno, desde las utilizadas por el hombre en la agricultura y la apicultura, hasta las producidas en forma natural por las plantas (Pistorius, 2014; Johnson, 2015). Hay insectos que son especialistas y han desarrollado mecanismos específicos para contrarrestar los efectos estas sustancias presentes en determinados néctares y/o pólenes (Després *et al.*, 2007).

La abeja *A. mellifera*, al ser una especie generalista, puede ser afectada por algunas de las sustancias que las plantas secretan o utilizan para defenderse de depredadores (Detzel & Wink, 1993; Adler, 2000). En la mayoría de las regiones donde se practica apicultura existen reportes de colonias intoxicadas por néctares y pólenes de una gran cantidad de especies botánicas, siendo reportados 36 géneros (Barker, 1990; Cintra, Malaspina & Bueno., 2005). En algunos

casos afecta sólo a las etapas larvarias (Sharma, Raj, & Garg, 1986; Pimentel & Message, 2004), en otros únicamente a los adultos (Palmer-Jones & Line, 1962; Batista & Cardoso, 2013), y en otros casos, se registra mortalidad de larvas y de adultos (Barker, 1990).

1.6- Mal de Río

El Mal del Río en abejas melíferas (MDR), es una enfermedad que ocurre a finales de la primavera, afectando a colonias que están cercanas a cursos de agua con abundante vegetación asociada, y se caracteriza por una mortalidad masiva de larvas que puede llevar a la muerte de la colonia por despoblación (Mendoza *et al.*, 2012; Harriet, 2012).

Esta enfermedad ha sido reportada en Uruguay desde mediados de 1940, apareciendo en apiarios ubicados en las cercanías del río Santa Lucía, desde entonces se presenta en forma esporádica, pero en los últimos 20 años ha sido reportada con mayor frecuencia, y se ha extendido en el litoral y en el centro del País (Mendoza *et al.*, 2012; Juri, Nogueira & Invernizzi, 2016; Nogueira *et al.*, 2016a, Nogueira, Juri, Santos & Invernizzi, 2020a), (Figura 14) y en las últimas temporadas ha sido diagnosticado en Argentina (INTA, 2019). Las colonias afectadas por MDR tienen un componente geográfico muy importante, afectándose todos los apiarios y todas las colonias de cada apiario de la zona donde se presenta (Invernizzi *et al.*, 2011b).

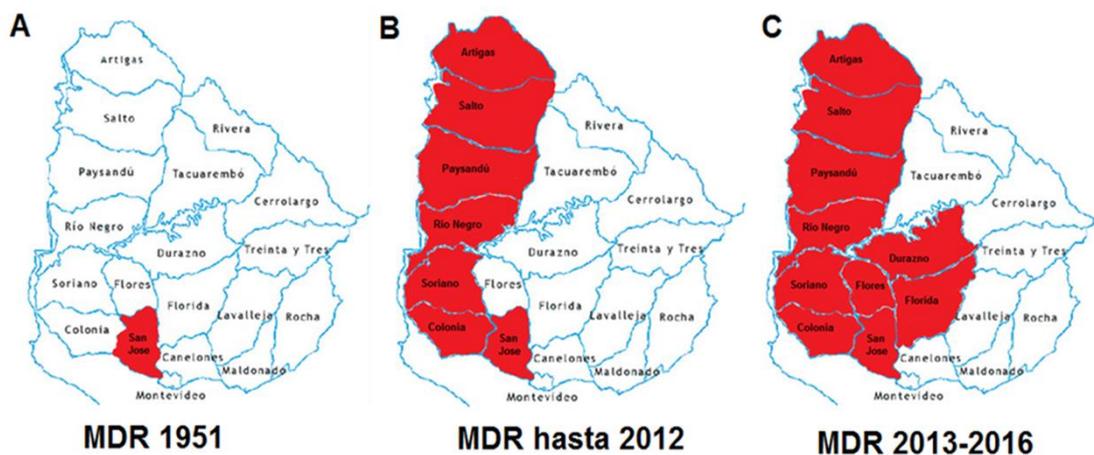


Figura 14: Distribución geográfica en Uruguay de la enfermedad MDR desde 1951 hasta el año 2016.

Las pérdidas económicas producidas por el MDR son importantes, pues la intoxicación ocurre durante la temporada apícola; Haller, Juri, Plaván & Nogueira, 2014, relevaron las pérdidas ocasionadas por el MDR en un grupo de productores apícolas, durante un período de 3 años, y las mismas fueron de 19,90 dólares por colmena en explotación por año, correspondiendo 51,8% a pérdidas de producción, 36,5% a pérdidas de colonias, 10,3% a manejos extra y 1,4% a otras pérdidas.

También se realizó el diagnóstico temprano de la enfermedad en condiciones de campo (Nogueira *et al.*, 2014), así como la detección de casos subclínicos (Nogueira *et al.*, 2016b). Se pudo comprobar que los embriones (huevos) no eran afectados (Nogueira *et al.*, 2016c) y que el traslado de colmenas afectadas no era efectivo si se trasladaban en forma tardía a un campo

seguro (Juri *et al.*, 2016a), e incluso puede llevar a transmitir el MDR a colonias sanas, que se encontraban en campos seguros, mediante el pillaje por parte de éstas a las colmenas con MDR trasladadas (Nogueira *et al.*, 2016a).

Recientemente, Inverinzzi *et al.* (2018) demostraron de que el MDR es una intoxicación producida por las excreciones de un insecto, *Epormenis cestri* (Hemíptera, Flatidae), asociado a árboles de Sarandí Colorado (*Sebastiania schottiana*), y tanto el insecto (Metcalf, 1957) como el árbol Sarandí Colorado (Grandtner & Chevrette, 2014), están distribuidos en amplias regiones de Argentina y Brasil, por lo que es esperable que esta intoxicación ocurra en esos países.

Los Flátidos se caracterizan por su estrecha relación con las plantas, y tienen un aparato bucal especializado para succionar el floema de las mismas (Huang, Zhang, Hong, 2019), la savia del floema contiene concentraciones muy altas de azúcares en relación a otros nutrientes esenciales, por lo que deben eliminar hasta el 90% del azúcar ingerido. Estas excreciones que van cayendo en las partes vivas de las plantas, son aprovechados por otros insectos como una importante fuente de energía (Douglas, 2009), y dado que las abejas suelen recolectarlas, son consideradas como un componente de la composición de la miel (Thrasylvoulou *et al.*, 2018, Codex, 2019). El hecho de que metabolitos secundarios de plantas, pasen del floema de las plantas a las excreciones de insectos succionadores de plantas, fue considerado por Molineaux *et al.* (1990), como forma de estudiar estas moléculas en las plantas.

Invernizzi *et al.*, (2018), reprodujeron la mortalidad larvaria en condiciones de laboratorio utilizando el mielato depositado en las colonias afectadas por el MDR, y también con las secreciones recolectadas de *Epormenis cestri*. Recientemente Rossini *et al.* (2021), a partir de extractos vegetales de *Sebastiania schottiana*, también reprodujeron la mortalidad larvaria en laboratorio, y la molécula involucrada es la xantoxilna. Viotti *et al.*, 2021, corroboraron que el mielato afecta la morfología de los oenocitos de las larvas afectadas y aumenta la localización e immunoexpression de caspasa- 3 por lo tanto aumenta la apoptosis celular en las células del cuerpo graso de las larvas intoxicadas.

El MDR al originarse por las excreciones de una población de insectos que tienen una dinámica poblacional muy compleja (Denno & Roderick, 1990) va a determinar qué en una región, en determinadas temporadas puedan ser importantes las poblaciones y por ende las excreciones que produzcan y en otras temporadas ser mínimas o inexistentes, explicando así que en determinadas zonas deje de reportarse el MDR luego de ocurrir en varias temporadas, y aparecer en regiones donde no se habían dado casos anteriormente.

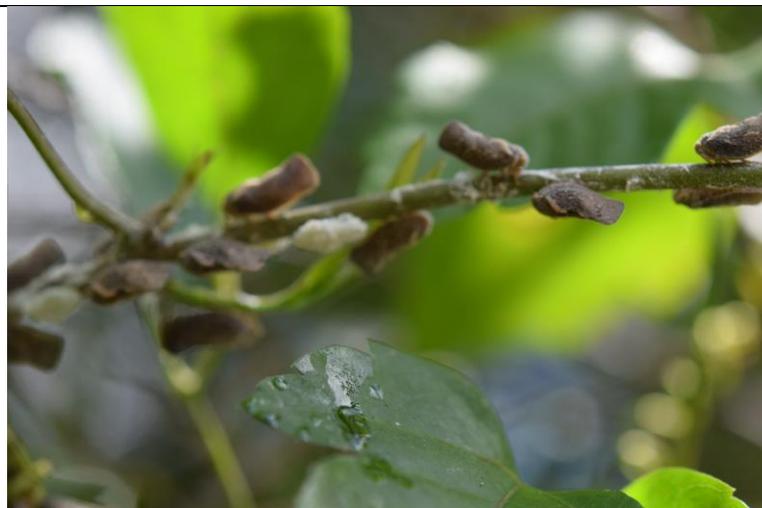
En una población de *Epormenis cestri*, sus individuos comienzan a desarrollarse en sus estadios de ninfa, sus excreciones pasan a ser cada vez de mayor volumen, y en algún momento son detectadas por las abejas y ellas comienzan a coleccionarlas (Figura 15).



A



B



C

Figura 15: *Epormenis cestri*: A) Estadio adulto, B) Ninfa C) Excreciones sobre las hojas.

Una vez que estas excreciones comienzan a llegar a la colonia, la mortalidad larvaria aparece en forma inmediata y afecta a todas las colonias del apiario, siendo el principal signo clínico de la intoxicación (Invernizzi *et al.*, 2018). En los cuadros clínicos más graves, una vez que nacieron las abejas que estaban operculadas el único estadio de la cría son los huevos ya que las larvas se mueren a las primeras horas de haber nacido, este signo clínico es patognomónico de MDR, sin embargo en los cuadros moderados y leves una cantidad variable de larvas sobrevive y es operculada, determinando el signo clínico de cría salteada, que es común a otros problemas que puedan estar presentes en ese mismo período, como Loque americana, Loque europea y Varroosis (Guzman & Correa, 2012; Ritter, 2014) o zánganos diploides por

endogamia (Rinderer, 2013), e inclusive ser pasado por alto en una revisión normal de la colmena y solamente ser diagnosticado mediante análisis de imágenes de la cámara de cría (Nogueira *et al.*, 2016a).

Santos & Invernizzi, (2020) estudiaron a *Epormenis cestri* en su hábitat, relevando las diferentes especies botánicas donde se hospeda, su ciclo y sus predadores, y se pudo observar a algunas aves y arácnidos predando los insectos, así como ninfas muertas atacadas por hongos y parasitadas por ácaros. Esto indicaría que varios organismos pueden actuar como controladores biológicos de las poblaciones de *E. cestri*, lo que podría sentar la base para estudiar las fluctuaciones que pueden tener sus poblaciones de una temporada a otra.

Considerando que generalmente la gravedad de las intoxicaciones está relacionada a la dosis del tóxico involucrado, y que trabajos anteriores han demostrado que el aporte de jarabe de azúcar a las colonias que están en una zona donde está ocurriendo el MDR, inicialmente permite una mayor sobrevivencia larvaria, aunque en poco tiempo ya no es eficaz para evitar la mortalidad masiva de las mismas (Nogueira *et al.*, 2021; Nogueira *et al.*, 2021b). Por otra parte, se documentó un caso en el cual se trasladaron algunas colmenas afectadas por el MDR a un apiario sano, y si bien las mismas tenían escasas reservas, ese mielato fue suficiente para producir diferentes grados de mortalidad larvaria en las decenas de colonias que pillaron a esas colmenas afectadas por MDR. De lo anterior surgen dos grandes preguntas 1) ¿El mielato tóxico que ocasiona el MDR puede ser tóxico a bajas dosis? Y 2) ¿La sobrevivencia de larvas está relacionada a la concentración del mielato tóxico en la dieta de las abejas?

2- HIPÓTESIS

La sobrevivencia larvaria es inversamente proporcional a la concentración del mielato tóxico en la dieta de las abejas.

3- OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- Relacionar la sobrevivencia larvaria con la concentración del mielato que produce el MDR.

3.2. Objetivos Específicos:

- Analizar la sobrevivencia larvaria en función de la concentración del mielato que produce el MDR
- Analizar el día de la muerte larvaria en función de la concentración del mielato que produce el MDR.
- Analizar el tamaño de las larvas sobrevivientes en función de la concentración del mielato que produce MDR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Manejo de las colonias

El estudio fue realizado en marzo de 2018 en INIA La Estanzuela, en el departamento de Colonia (Ruta 50 Km 11, Dpto. de Colonia, coordenadas GPS: 34° 20' 23.72" S – 57° 41' 39.48" O).

Se conformaron 20 núcleos de aproximadamente 6000-8000 abejas con una reina fecundada y se instalaron en nucleros con tres panales obrados vacíos, un alimentador interno y una torta de polen polifloral de 500 gramos. Se instalaron 5 colonias en cada carpa, de forma que en cada una de las carpas las colonias recibían las 5 posibles concentraciones de miel/mielato (Figura 16).

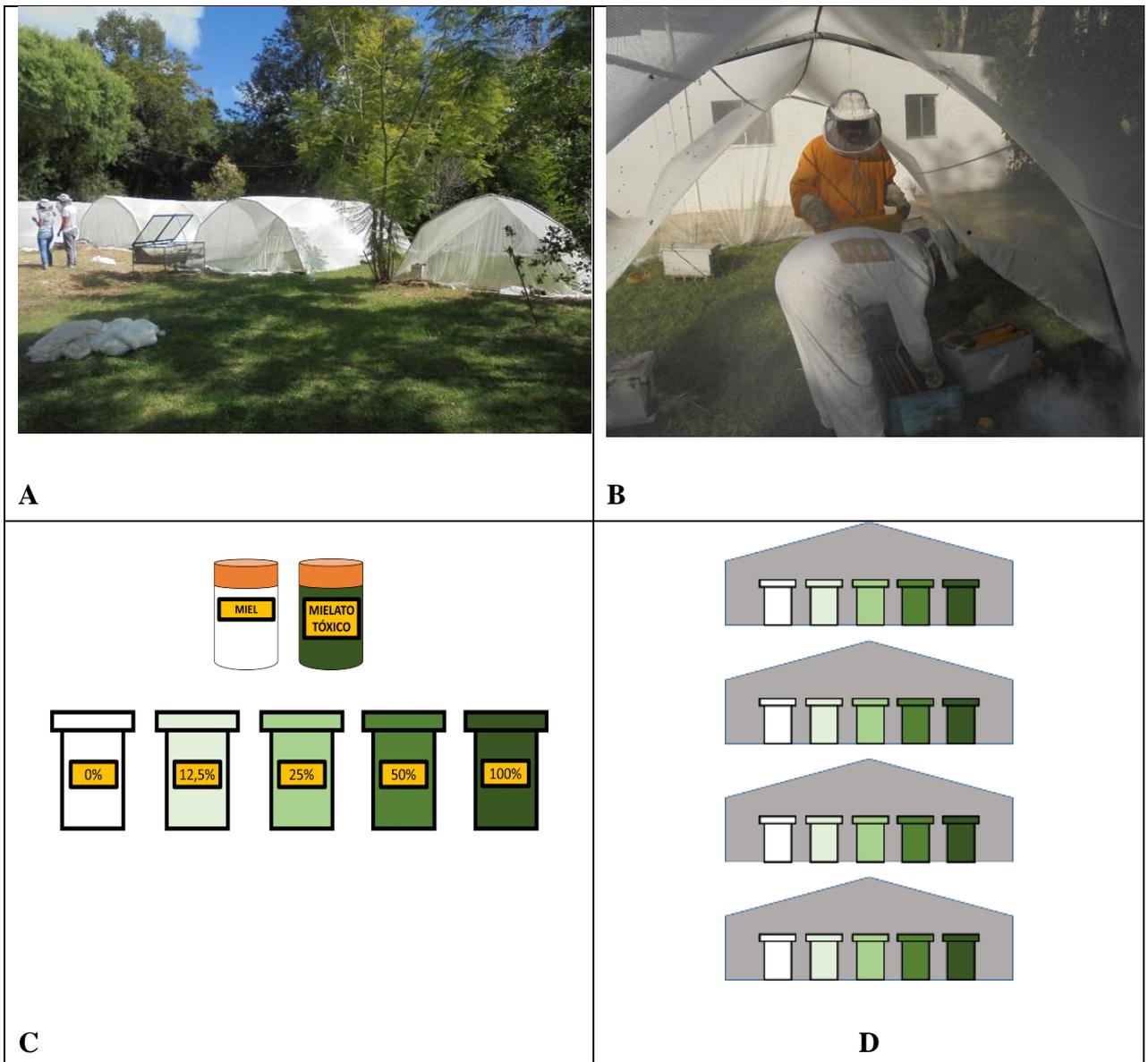


Figura 16: A) y B) Carpas de tul de 4 x 6 m que fueron utilizadas para que las colonias no puedan traer recursos y deban utilizar lo que se les oferta para alimentarse, C) grupos de acuerdo a las proporciones de miel y mielato tóxico ofertados y D) disposición de los grupos en las carpas.

Cada una de las cinco colonias de cada carpa recibió 2 kg de una mezcla de mielato provenientes de colmenas afectadas por Mal del Río y miel de colonias sanas de acuerdo a las siguientes proporciones en el contenido de mielato: I) 0%, II) 12,5%, III) 25%, IV) 50% y V) 100% (Figura 16: C y D)

El mielato utilizado fue cosechado de colonias afectadas en forma grave por Mal del Río al grado de que la mortandad de larvas fue total. El mismo fue tipificado como mielato por el laboratorio QSI (Alemania). La miel de colmenas sanas fue obtenida de un apiario del departamento de Canelones. La tipificación del origen botánico mediante técnicas palinológicas dio por resultado una miel polifloral, con mayor presencia de *Lotus spp.*, *Eucalyptus spp.* y *Schinus longifolius*. El mielato y la miel fueron templados en estufa a 30 °C por 24 hs, y luego se pesaron para lograr las proporciones de 12,5% 25% y 50% de mielato-miel. Cada mezcla fue homogeneizada mediante una mezcladora de alimentos, y luego envasada e identificada a efectos de ofertarla a la colonia correspondiente (Figura 17 A).

Las tortas de polen se hicieron a partir de polen almacenado en panales, de colmenas sanas, extraídos utilizando un equipo extractor de polen (Wilara 10935). El polen extraído fue amasado y mezclado con un 10% al peso de jarabe de sacarosa 1/1 para unirlo y lograr una consistencia semisólida (Figura 17 B).





Figura 17: Preparación de la carpa y alimento que se les aporta: A) miel/mielato y B) tortas de polen.

4.2- Fotografía de la cría y análisis de imágenes

Se utilizó una cámara Nikon D 5300 con objetivo Nikkor de 50 mm, montado sobre un bastidor que permite mantener la distancia y el ángulo entre la cámara y los panales fotografiados (Figura 18).

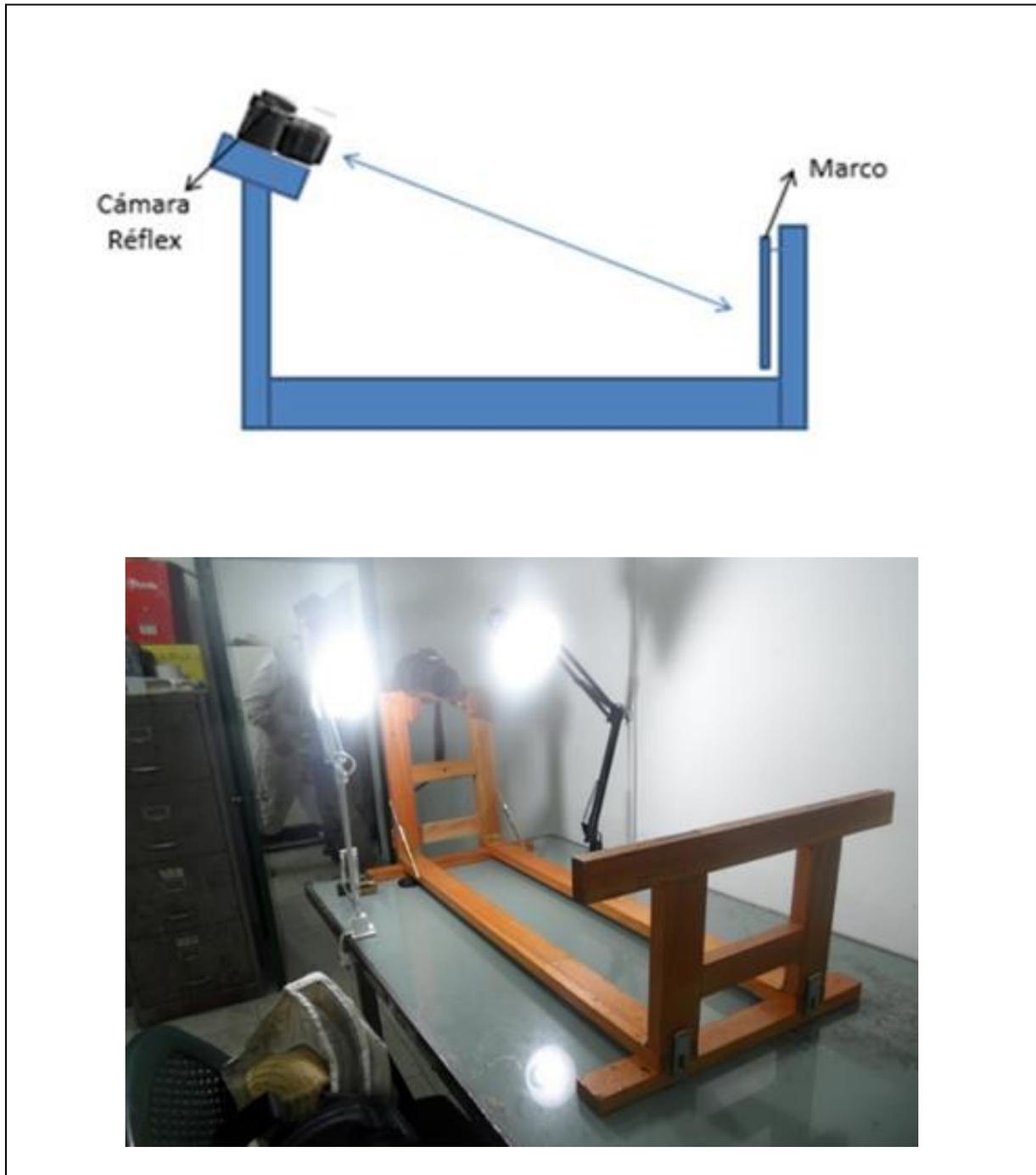


Figura 18: Esquema y foto del bastidor que porta la cámara y el cuadro.

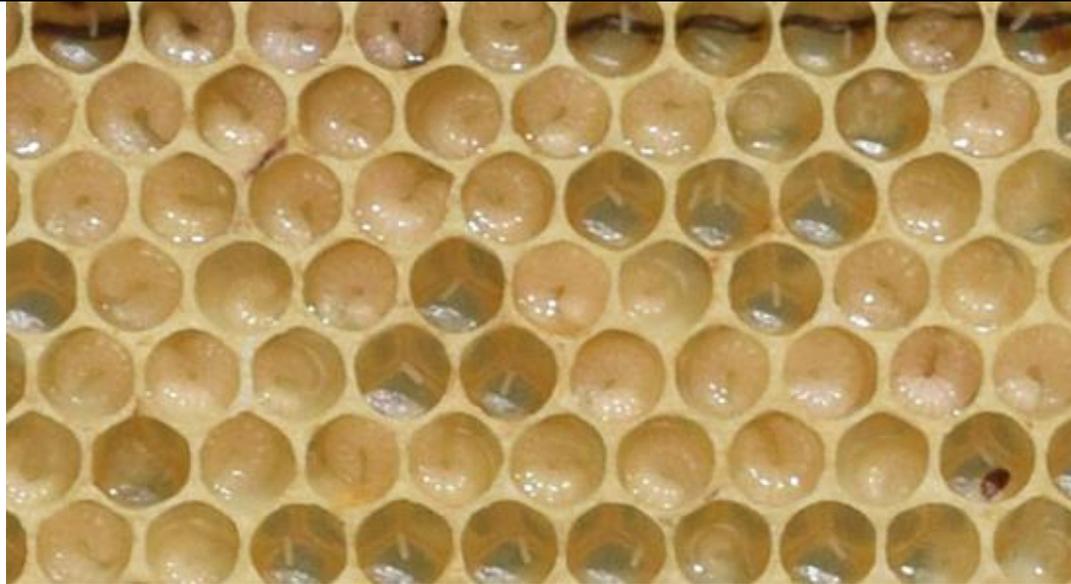
Al tercer día de instalados los núcleos de abejas en las carpas, se seleccionó un cuadro con huevos de cada colonia, se lo marcó y se lo fotografió diariamente durante nueve días, de forma de poder realizar el seguimiento desde que emergió la larva del huevo hasta que su celda fue operculada. No se observó rechazo al alimento aportado.

A las imágenes fotográficas de los panales se les superpuso una grilla digital que encerraba 195 celdas en la zona del panal con más huevos. Así, se pudo seguir el desarrollo de cada larva originada de un conjunto de 100 a 150 huevos por colonia. Con esta información se construyeron curvas de sobrevivencia de larvas para cada colonia.

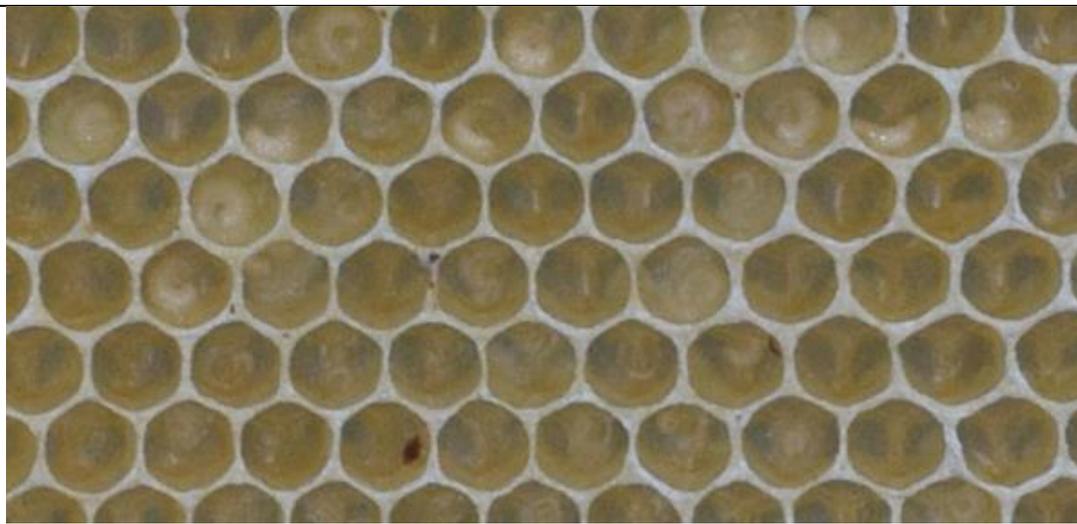


Figura 19: Grilla que se superpone en la fotografía de los cuadros para contabilizar la sobrevivencia larvaria en un mismo sector día a día. (A y B) Celdas coloreadas que serán contabilizadas (B).

En los grupos de colonias que registraron larvas sobrevivientes al quinto día (luego la celda es operculada), se midió el área a 20 larvas utilizando el programa *Image J*. En el caso de que no existieran larvas sobrevivientes suficientes dentro del área de la grilla, se utilizaron larvas de otro sector del panal, realizando el seguimiento de las fotos de cada día a efectos de confirmar la edad de las larvas seleccionadas.



A



B

Figura 20: A) Larva de tamaño normal respecto al día de nacida y B) Larva de menor tamaño respecto al día de nacida.

4.3 Análisis estadísticos

Se analizaron las variables dependientes mortalidad de larvas y el tamaño de larvas (área de larvas en mm) que llegaron al quinto día de las colonias sometidas a diferentes concentraciones de mielatos al 25%, 12,5% y 0% (variable independiente o factor). Las variables fueron comparadas con el test de Kruskal-Wallis y un test post *hoc* de Tukey. Luego fueron presentadas como medias \pm e.e.m, el nivel de significancia fue de $P < 0,05$.

5- RESULTADOS

Sobrevivencia larvaria

La sucesión de fotografías tomadas a partir de un panal con huevos de las colonias alimentadas con diferente concentración de mielatos permitió establecer curvas de mortalidad larvaria en cada una.

La mortalidad larvaria de las colonias que recibieron mielatos en concentración de 100%, 50% y 25% superó el 90%, mostrando diferencias significativas con la mortandad hallada en las colonias que recibieron mielatos en concentración 12,5% y 0% (55% y 22%, respectivamente).

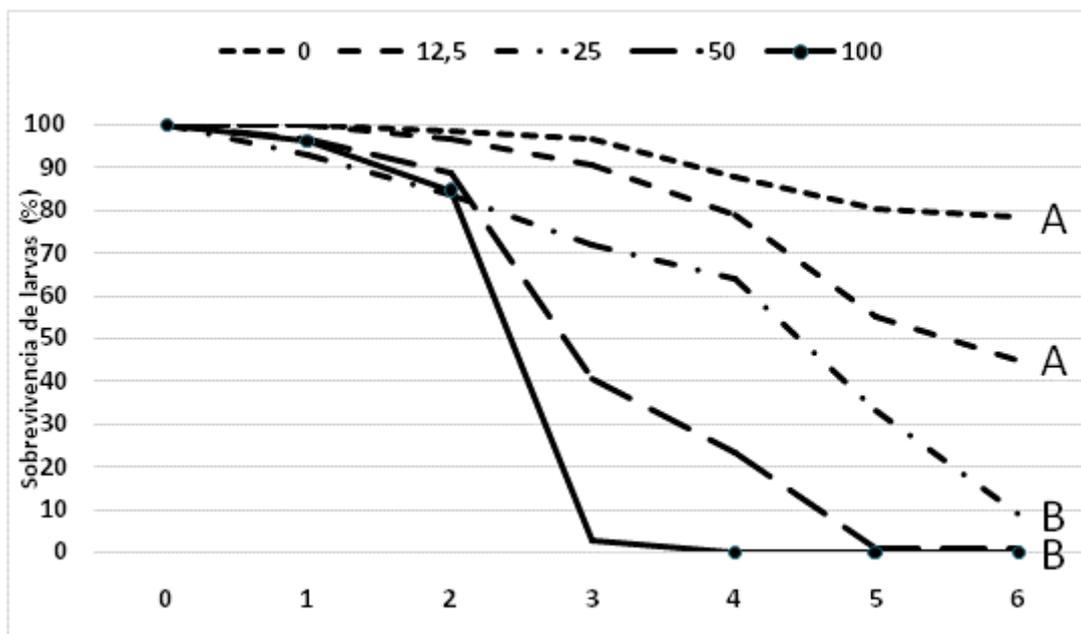


Figura 21: Curvas de supervivencia de colonias que recibieron mielatos provenientes de colonias afectadas por el Mal del Río en diferentes concentraciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) para el test de Tukey.

Tamaño de las larvas:

El tamaño de las larvas fue determinado en las larvas de cinco días. Como no hubo prácticamente larvas sobrevivientes en las colonias que recibieron mielatos en concentraciones de 100% y 50%, el estudio se hizo solo con las larvas de las colonias que recibieron mielatos en concentraciones de 25%, 12,5% y 0%.

El tamaño de las larvas varió en las colonias de acuerdo a la concentración de mielato recibida, siendo menor a mayor concentración, aunque con una diferencia significativa entre las larvas de colonias que recibieron mielatos en concentraciones de 25,5% y 12,5% (Figura 22).

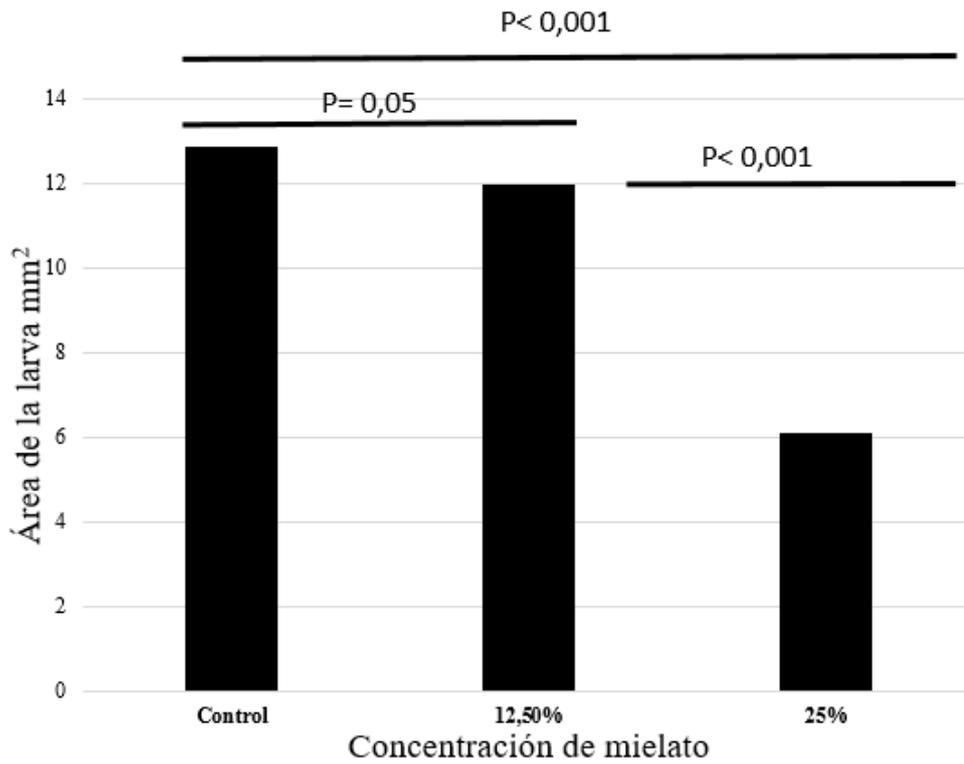


Figura 22: Tamaño de las larvas de cinco días en colonias de abejas que recibieron mielatos provenientes de colonias afectadas por el Mal del Río en diferentes concentraciones. Se indican los niveles de significación para el test de Tukey.

6- DISCUSIÓN

Históricamente el Mal del Río fue descrito como una enfermedad de origen ambiental que mata masivamente las larvas de un día de edad, por lo que al cabo de unos días no se encuentra cría en las colonias salvo huevos (Mendoza *et al.*, 2012; Harriet, 2012). Este cuadro fue corroborado en el este ensayo cuando se les ofrece a las colonias dosis de mielato al 25% o mayores.

Sin embargo, la posibilidad de que concentraciones menores de mielatos (por ejemplo, ante una población reducida de *E. cestri*) tuviera efectos diferentes en las larvas, como una mayor sobrevivencia, muerte en un momento más avanzado del ciclo y efecto en el tamaño, no había sido contemplada. Experimentos donde se suministró jarabe de azúcar a las larvas mostraron que una dilución del mielato podía mejorar la sobrevivencia de las larvas (Nogueira *et al.*, 2021b). La molécula responsable de la muerte de la larva es la xantoxilina (Rossini *et al.*, 2021). La xantoxilina se encuentra en diferentes especies de árboles de las familias Euphorbiaceae, Piperaceae, Apiaceae y Rutaceae, presentando actividad antiáfida (Chermenskaya *et al.*, 2012). Los Sarandíes colorados (*Sebastiania schottiana*) donde se concentra *E. cestri* pertenece a la familia Euphorbiaceae.

Las poblaciones de insectos succionadores de savia pueden variar de manera sustancial año a año (Denno & Roderick, 1990), por lo que el escenario planteado de variación en la disponibilidad de mielatos es probable. El hecho de que el MDR se presente algunos años y otros no, y varíe entre zonas (Mendoza *et al.*, 2012; Harriet, 2012), implica que las poblaciones de *E. cestri* sufren fuertes fluctuaciones.

Los resultados hallados en este estudio muestran que la cantidad de mielato que ingresa a las colmenas puede determinar efectos múltiples.

En primer lugar, es destacable como el mielato utilizado que se obtuvo de colonias con MDR con mortandad total de larvas, pero seguramente tenía néctar de origen floral, causaba la mortandad de más del 90% de las larvas aún con una dilución al 25%. Esto nos permite conjeturar que en un ambiente o año donde la población de *E. cestri* es reducida, las consecuencias en la mortalidad larvaria, no sería diferente a la hallada cuando la población del insecto es importante. Recién cuando la concentración de mielato se reduce 8 veces encontramos una sobrevivencia de 45% de las larvas. Aún en este caso, el efecto a nivel colonia sería importante, posiblemente con despoblamiento, ya que en las colonias sanas el porcentaje de sobrevivencia normal supera el 85% (Fukuda & Sakagami, 1968; Garófalo, 1977). A nivel de campo, el salteo de la cría de una situación similar podría llevar a confusión de los síntomas de este cuadro leve de MDR con los de otras enfermedades que afectan a la cría como las enfermedades bacterianas Loque Americana y Loque Europea o niveles elevados de infestación por *Varroa destructor*.

Las colonias que solo recibieron miel tuvieron una mortandad larvaria importante (22%), superior a la hallada en similares condiciones en otros estudios (menor al 15%). La diferencia puede deberse a condiciones ambientales o del experimento que no son fáciles de identificar.

Un segundo efecto de la concentración de mielatos se dio en la edad en que se mueren las larvas. Las curvas de mortandad muestran que las larvas, especialmente las de las colonias que recibieron el mielato en concentraciones de 50%, 25% y 12,5%, pueden morir en diferentes momentos de los cinco días que dura su ciclo. La mortalidad larvaria en las colonias que recibieron solo mielato se concentró entre el segundo y tercer día, y no en el primero como era de esperar. Esto posiblemente se deba a que los núcleos para el ensayo se armaron mayormente con abejas nodrizas provenientes de colonias sanas, de forma que ya tenían jalea real acumulada previo a la oferta del mielato. Esta jalea real la comenzaron a utilizar recién cuando empezaron a nacer las larvas de la postura de la reina en el núcleo, por lo que se demoró en circular el tóxico (al menos en una concentración letal) y esto explicaría la diferencia inicial con las mortalidades que se registran en condiciones de campo.

Este resultado es importante ya que amplía la sintomatología hasta ahora descrita (muerte de larvas de un día), incorporando la posibilidad de muerte de las larvas a mayor edad en situaciones con menor oferta de mielatos. Este nuevo cuadro puede pasar desapercibido por los apicultores (se observan larvas de todas las edades) o confundidas con otros problemas sanitarios o nutritivos. Esta situación puede presentarse al inicio o al final de cuadros graves de MDR, cuando la oferta de mielatos no es suficiente para causar la muerte masiva de larvas.

Un tercer resultado importante que se encontró en este estudio es que las larvas sobrevivientes de las colonias que recibieron las concentraciones más bajas de mielato (25% y 12,5%) presentaron menor tamaño que las larvas de colonias alimentadas con miel. El menor tamaño de las larvas puede ser producto del estrés generado por la intoxicación. En este sentido, recientemente Viotti *et al.*, 2021, encontraron que la ingestión de mielatos altera la morfología, localización y la inmunoexpresión de la proteína inductora de apoptosis caspasa-3 en oenocitos y trofocitos del cuerpo graso. Otro factor que puede determinar el menor tamaño de las larvas de las colonias alimentadas con mielatos es la menor movilidad de éstas en las celdas lo que provocaría una tasa de ingesta de alimento menor. La menor movilidad de las larvas intoxicadas fue observada en el laboratorio en una experiencia de cría artificial (Arredondo, comunicación personal). El hecho de que las larvas sobrevivientes a la intoxicación por mielatos sean más chicas al momento de que las abejas sellen sus celdas para iniciar la fase de pupa, determina que emerjan abejas más pequeñas y con probables secuelas de la intoxicación. Estas abejas podrían tener una menor expectativa de vida y restricciones fisiológicas (ej. funcionamiento de glándulas), que en último término afecten a las colonias. Nos encontramos así que la intoxicación de las larvas por las excreciones de *E. cestri* pueden generar dos situaciones diferentes respecto a las abejas adultas. Mientras que en los cuadros graves las larvas mueren en su totalidad y las abejas adultas no se ven afectadas (no hay indicios de que ocurra), en situaciones donde el aporte de mielatos es reducido las larvas sobrevivientes pueden dar lugar a abejas adultas que no se desempeñen igual que las abejas normales. Este efecto indirecto de los mielatos en las abejas adultas y en último término en el funcionamiento de la colonia es un tema a abordar en el futuro.

En suma, este estudio muestra que el Mal del Río es una enfermedad de las larvas de abejas con una sintomatología más compleja que la descrita históricamente dependiendo de la concentración de mielato disponible en el ambiente y permite relacionar los diferentes cuadros

clínicos que se observan a nivel de campo con la proporción de mielato tóxico y miel que pueden estar consumiendo las colonias (Figuras 23 y 24).

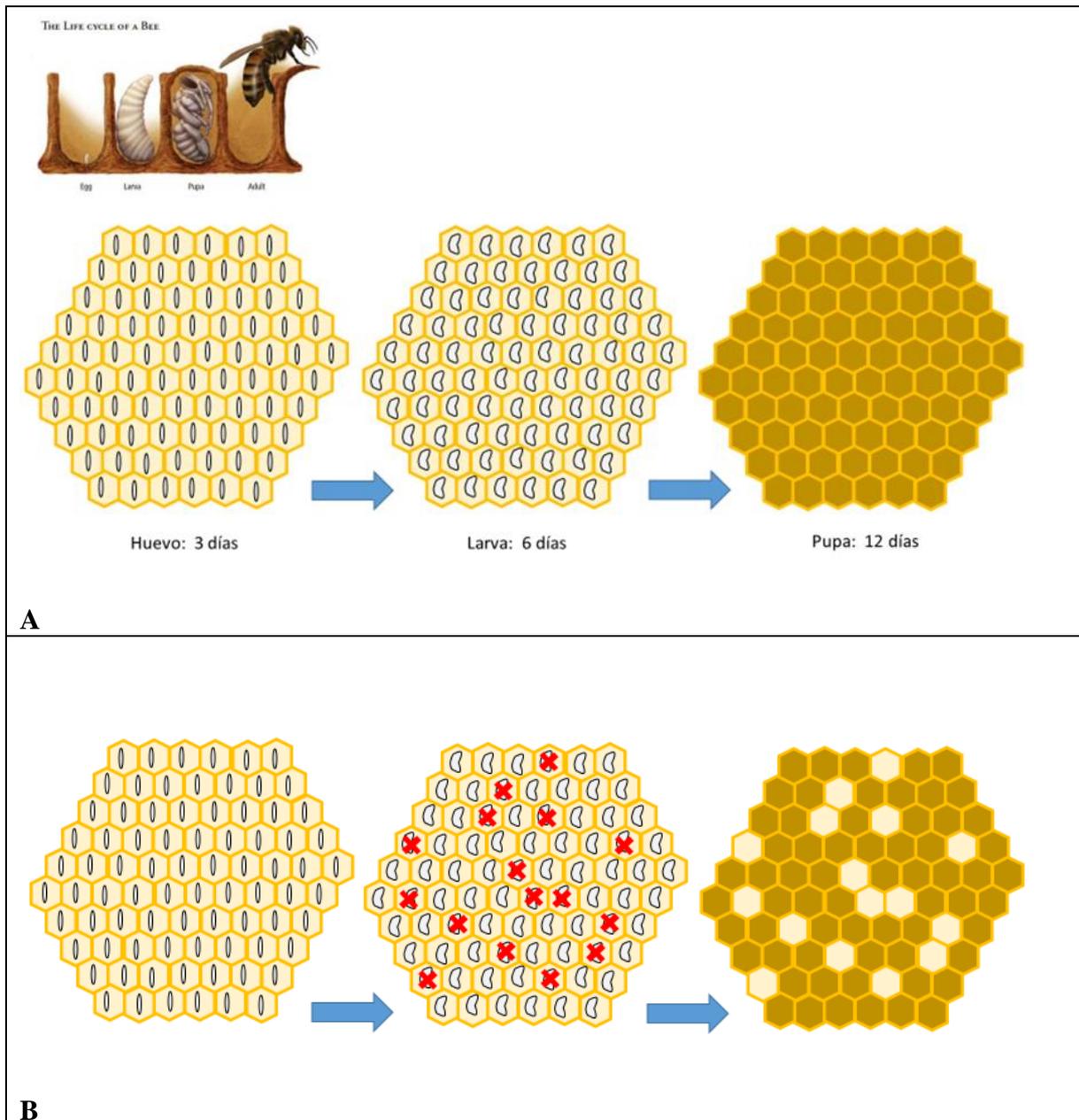
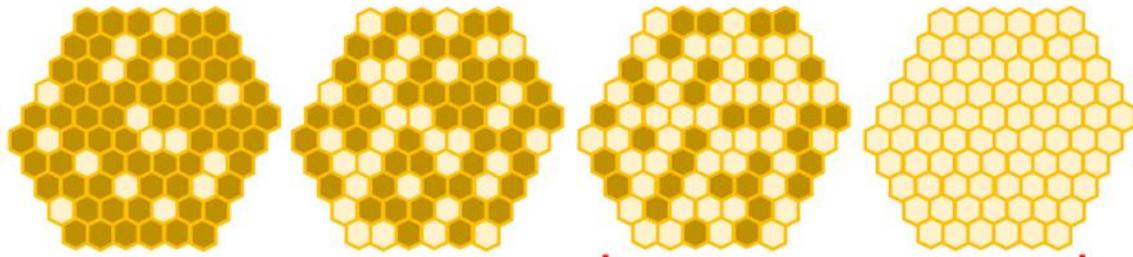


Figura 23: Esquema de como se ve en el panal el ciclo de desarrollo de la abeja A) Normal, donde cada huevo se transforma en una larva que luego es operculada dando un patrón compacto B) la muerte de larvas-(cruces rojas) ocasiona el patrón de cría salteada en la cría operculada, donde se van a alternar celdas operculadas con celdas vacías.



Cuadros Leves

Las colonias se desarrollan más lentamente. Pueden ser subclínicos si la muerte es en "parches", pues no se ve el salteo.

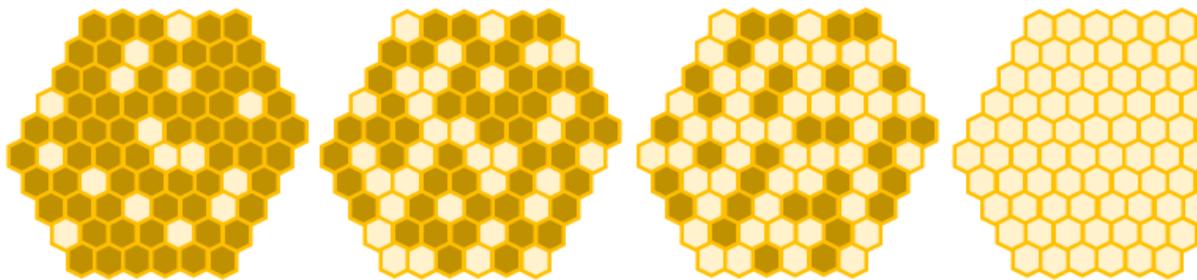
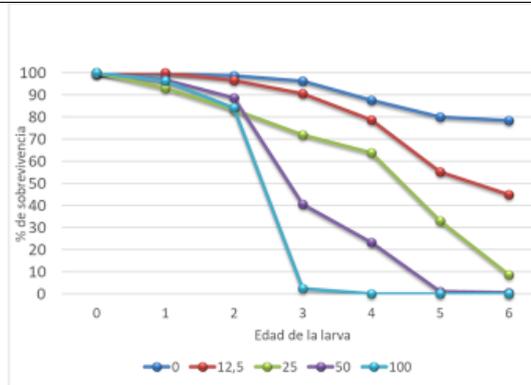
Cuadros Moderados

Las colonias no se desarrollan. Es posible ver acumulación de polen.

Cuadros Graves

Las colonias se van despoblando. Se acumulan varios cuadros de polen en la cámara de cría.

A



B

Figura 24. A) Cuadros de Mal del Río leves, moderados y graves de acuerdo a la sobrevivencia larvaria (patrón de salteo de la cría) B) Concentración de mielatos y sobrevivencia larvaria y como se relacionaría con el patrón de salteo de la cría.

7- CONCLUSIONES

El análisis de la sobrevivencia larvaria a distintas concentraciones de mielato tóxico para MDR nos permitió observar la gran variante sintomatológica de la enfermedad y cuán dependiente es el cuadro clínico a la concentración del mielato tóxico consumido, ya que podemos destacar que en colonias afectadas por MDR con una concentración tóxica mayor al 25% la mortalidad larvaria es de más del 90% y cuando se reduce 8 veces (12,5%) la sobrevivencia es del 45%, de todas formas en este caso el efecto del despoamiento a nivel de la colonia no deja de ser importante.

También destacamos que con respecto a la edad de las larvas con concentraciones menores al 50% las mismas pueden morir en diferentes momentos del ciclo y no solo el día 1 como estaba descrito, lo que incluye más variantes del cuadro y es importante para ser tenido en cuenta por los apicultores y tomar medidas o realizar un análisis exhaustivo ante sospecha o diferencial de otras afecciones, implementar medidas de control o preventivas para evitar mayores pérdidas. Algo no menos importante que podemos concluir es que las larvas sobrevivientes de las colonias que recibieron las concentraciones más bajas de mielato (25% y 12,5%) presentaron reducción del tamaño, lo que también se asocia con el futuro de sobrevivencia de la colmena por la enfermedad.

El MDR es una enfermedad de las larvas con sintomatología más compleja de la descrita históricamente, el escenario del cuadro es muy dependiente de la concentración del mielato en el ambiente, al estar tan influenciado por factores externos, por ejemplo, la región geográfica, árboles y no solo relacionado a la abeja, sino a la toxicología general de la enfermeda.

Este experimento ha sido de gran aporte para confirmar medidas de control y prevención que ya habían sido descritas como cambiar las colmenas de lugar cuando empiezan a observarse signos clínicos de la enfermedad, asociada con la presencia de *E. cestri* y la vegetación para así salvaguardar nuestros apiarios y biodiversidad y plantear nuevas interrogantes con las variantes encontradas en la presentación de los signos, por ejemplo el efecto indirecto de los mielatos en las abejas adultas y en el funcionamiento de la colonia.

8- BIBLIOGRAFÍA

- Adler, L. (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, 3, 409-420.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. (2009) Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles. Paris: AFSSA.
- Alippi, A. (2014). Bacterial diseases of honeybees. En: W. Ritter, *Bee health and veterinarians* (pp. 117-124). Paris: OIE.
- Altieri, M.A., Nicholls, C.I., Gillespie, M., Waterhouse, B., Wratten, S., Gbèhounou, G., & Gemmill-Herren, B. (2015). *Crops, weeds and pollinators. Understanding ecological interaction for better management*. Roma: FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3821e.pdf>
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campa, J., Zunino, P., & Antúnez, K. (2015). Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 532-540.
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., Van Engelsdorp, D., & Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, 48, 364-370
- Balbuena, S., Copola, N., & Juri, P. (2017). *Estudio del desarrollo de la cámara de cría de colmenas sanas y afectadas por el "MAL DE RIO", utilizando análisis de imágenes* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Barker, R.J. (1990). Poisoning by plants. En: R.A. Morse, & R. Nowogrodzki, *Honey bee pests, predators, and diseases*. Ithaca: Cornell University Press.
- Batista, I., & Cardoso, M. (2013). The pollen of *Caesalpinia pyramidalis* Tul is toxic to honeybees (*Apis mellifera*). *Arthropod-Plant Interactions*, 7, 463–466
- Chaplin-Kramer, R., Sharp, R., Weil, C., Bennett, E., Pascual, U., Arkema, K., ... Daily, G. (2019). Global modeling of nature's contributions to people. *Science*, 366, 255–258
- Cintra, P., Malaspina, O., & Bueno, O.C. (2005). Plantas tóxicas para abelhas: artigo de revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 547-551
- Codex. (2019). Codex Alimentarius, Standard for Honey CXS 12-1981 Adopted in 1981. Revised in 1987, 2001. Amended in 2019.
- Comisión Honoraria de Desarrollo Apícola. (2018). *Sector Apícola: Estadísticas de Comercio Exterior*. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/noticias/informe_sector_apicola_-_comercio_exterior_0.pdf Fecha de consulta: 21/10/2021
- Cordara, J.J. (2007). *La Historia de la Apicultura en el Uruguay*. Montevideo: Facultad de Ciencias Agrarias, UDE.
- Crane, E. (1999). *The world history of beekeeping and honey hunting*. Routledge.

- Crane, E. (2009) *Apis* Species: (Honey Bees). En: Resh VH, Cardé RT (Eds.) *Encyclopedia of Insects*. 2ª ed. Burlington. Elsevier, pp 31-32. .
- Despres, L., David, J.P., & Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 298-307
- Denno, R. F., & Roderick, G. K. (1990). Population biology of planthoppers. *Annual review of entomology*, 35(1), 489-520.
- Detzel, A., & Wink, M. (1993). Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology*, 4, 8-18
- Dirección de Educación Agraria. (s.f.). *Manual de apicultura*. Buenos Aires: Dirección de Educación Agraria. Dirección Provincial de Educación Técnico Profesional.
- DIEA (2020) Anuario Estadístico Agropecuario 2020. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/anuario-estadistico-agropecuario-2020> Fecha de consulta: 21/10/2021
- Douglas, A. E. (2009). Honeydew. In: *Encyclopediad of Insects*, pp. 461–643. Resch, V. H. and Cardé, R. T., Eds., Academic Press, Burlington
- Fukuda, H., & Sakagami, S. F. (1968). Worker brood survival in honeybees. *Researches on Population Ecology*, 10(1), 31-39.
- Fries, I. (2014). Microsporidia. En: W. Ritter, *Bee health and veterinarians* (pp. 125–129). París: OIE.
- Gallai, N., Salles, J., Settele, J., & Vaissière, B. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68, 810–821.
- Garofalo, C. A. (1977). Brood viability in normal colonies of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 16(1), 3-13.
- Guiomar, N.P. (2011) Genética del comportamiento: Abejas como modelo. *Acta Biológica Colombiana*, 16 (3): 213-229.
- Guzmán Novoa, E., & Correa Benítez, A. (2012). Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas.
- Haller, A., Juri, P., Plaván, E y Nogueira E (2014) Cuantificación de pérdidas económicas causadas por el mal del río a productores apícolas de la 63 cooperativa calay en 3 temporadas (2010 – 2012). *XI Congreso Latinoamericano de Apicultura – FILAPI 2014*, Misiones, Argentina. P152.
- Harriet, J. (2012). Sendos aportes del Dr. Homero Toscano en los años setenta sobre el “Mal de Santa Lucía”. *Actualidad Apícola*, 95, 27-29.
- Huang, H. J., Zhang, C. X., & Hong, X. Y. (2019). How does saliva function in planthopper–host interactions?. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 100(4), e21537.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (S.f.). *Manual de apicultura*. Buenos Aires: INTA, Ministerio de Agroindustria.

- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2019. *Posibles casos de apiarios afectados por el “mal del río” en el litoral entrerriano*. Recuperado de: <https://inta.gov.ar/noticias/posibles-casos-de-apiarios-afectados-por-el-mal-del-rio-en-el-litoral-entrerriano>, fecha de consulta 18/10/2021
- Invernizzi, C., & Antúnez, K. (2018). Estimados Investigadores y Técnicos Apícolas. En *Congreso Latinoamericano de Apicultura* (pp. 6). *Libro de resúmenes*. Montevideo: FILAPI. Recuperado de https://inta.gov.ar/sites/default/files/xxxiii_congreso_latinoamericano_de_apicultura_2018-peinado.pdf
- Invernizzi, C., Nogueira, E., Juri, P., Santos, E., Arredondo, D., Branchiccela, B., ... Antunez, K. (2018) *Epormenis cestri* secretions in *Sebastiania schottiana* trees cause mass death of honey bee *Apis mellifera* larvae in Uruguay. *PLoS ONE* 13(1): e0190697. doi.10.1371/journal.pone.0190697
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J.P., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., & Zunino, P. (2011a). Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 47(181), 15–27.
- Invernizzi, C., Santos, L. E., García, E., Daners, G., Di Landro, R., Saadoun, A., & Vique, C. C. (2011b). Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations. *Archivos de zootecnia*, 60(232), 1303-1314.
- Johnson, R.M. (2015). Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology*, 60, 415-434
- Juri, P., Nogueira, E., Invernizzi, C. (2016). Evolución de las colonias de un apiario afectado por el Mal del Río, que fue trasladado en forma tardía a una 64 zona segura. *XII Congreso Latinoamericano de Apicultura y VI Congreso Cubano de Apicultura*, La Habana, Cuba, CD Rom.
- Juri, P., Santos, E., Arredondo, D., Branchiccela, B., Antúnez, K., & Rossini, C. (2020). Identificación de los agentes causales del mal del río en las abejas melíferas. Montevideo: INIA.
- Kilani, M. (1999). Biology of the honeybee. En M.E. Colin, B.V. Ball, M. Kilani (Ed.). *Bee disease diagnosis*. Zaragoza: CIHEAM.
- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., ... Eguaras, M. (2016). Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47, 835-854
- Martínez-Puc, J. F., & de Ayala, L. R. M. P. (2017). Biología de la abeja. *Lic. Gerardo Montero Pérez*, 17.
- Martínez-Pérez de Ayala, L.R., Martínez-Puc, J.F. & Cetzal-Ix, W.R. (2017). *Apicultura: Manejo, Nutrición, Sanidad y Flora Apícola*. Campeche: Universidad Autónoma de Campeche.
- Mendizabal, F.M. (2005). *Abejas*. Buenos Aires: Albatros.
- Mendoza, Y., Harriet, J., Campá, J., Roth, F., Termezana, D., & Mancuello, M. (2012). Mal del Río o Mal de Santa Lucía. *Actualidad Apícola*, 94, 8-9.

- Metcalf, Z. P. (1957). General catalogue of the Homoptera. Fascicle IV. Fulgoroidea. Part 13. Flatidae and Hypochthonellidae.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2020). *Anuario Opya 2020*. Montevideo: MGAP. Recuperado de <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/anuario2020/anuario2020.pdf> fecha de consulta: 21/10/2021
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2021a). *Exportaciones de productos apícolas por Año/Rubro*. Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/RegistroApicola/arExpoAnioRubroWEB.aspx> Fecha de consulta: 21/10/2021
- Ministerios de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2021b). Consumo de miel en Uruguay. Recuperado de: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/consumo-miel-uruguay-0>. Fecha de consulta: 21/10/2021
- Mortiz Pettis, J., & Delaplane, K. (2010). Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie*, 41, 256-263
- Mortensen, A. N., Smith, B., & Ellis, J. D. (2015). The Social Organization of Honey Bees. *IFAS Extension, University of Florida, ENY, 166*, 4p.
- Negrin, I. (2009) *Gestión de empresas apícolas*. (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Económicas y de Administración, UDELAR, Montevideo
- Nogueira, E., Haller, A., Juri, P. & Plaván E (2014) Mal del río: diagnóstico temprano y seguimiento del cuadro. *XI Congreso Latinoamericano de Apicultura – FILAPI 2014*, Misiones, Argentina. p162. 65
- Nogueira, E., Juri, P., Pedrana, G., & Invernizzi, C. (2016a) Diagnóstico subclínico del Mal del Río en abejas melíferas utilizando análisis de imágenes de la cámara de cría. *XII Congreso Latinoamericano de Apicultura y VI Congreso Cubano de Apicultura*, La Habana, Cuba. CD Rom.
- Nogueira, E., Juri, P., Pedrana, G., & Invernizzi, C. (2016b). Los embriones de colonias afectadas por el Mal del Río son viables. *XII Congreso Latinoamericano de Apicultura y VI Congreso Cubano de Apicultura*, La Habana, Cuba. CD Rom
- Nogueira, E., Juri, P., Santos, E., & Invernizzi, C. (2021a). Honeydew honey production in honey bees colonies affected by the River disease in Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 25(1),e410.
- Nogueira E, Juri P, Invernizzi C. (2021b).Effect of sugar syrup on larval survival in honey bee colonies affected by River disease. *Veterinaria* (Montevideo), 57(215)
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2008). *Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Los polinizadores: su biodiversidad poco apreciada, pero importante para la alimentación y la agricultura* (IT/GB-3/09/Inf. 10). Túnez: FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-be104s.pdf>

- Palmer-Jones, T., & Line, L. (1962). Poisoning of honey bees by néctar from the karaka tree (*Corynocarpus leavigata* J. R. et G Forst.) *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 5(5-6), 433-436.
- Pimentel, A. & Message, D. (2004). A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoideae) which causes sacbrood-like symptoms. *Apidologie*, 35, 89-90
- Pistorius J (2014) Bee poisoning incidents En: Ritter W. Bee health and veterinarians. Paris, OIE, p 181-186.
- Quero, A. (2004). Las abejas y la apicultura. En *Curso de verano: Las abejas y la apicultura en Asturias*. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Real Academia Española. (2014). *Diccionario de la lengua española* (23ª ed.). Madrid: RAE. Recuperado de <https://www.rae.es/> fecha de consulta: 21/10/2021
- Rinderer, T. E. (Ed.). (2013). Bee genetics and breeding. Academic Press.
- Ritter, W. (2014). *Bee Health and Veterinarians*. París: OIE.
- Ritter W & Allsop M. (2014). Predators and pests of honeybees. En: W. Ritter, *Bee health and veterinarians* (pp. 143-147). Paris: OIE.
- Rossini, C., Almeida, L., Arredondo, D., Antúnez, K., Santos, E., Haralambides, A. R., & Invernizzi, C. (2021). When a Tritrophic Interaction Goes Wrong to the Third Level: Xanthoxylin From Trees Causes the Honeybee Larval Mortality in Colonies Affected by the River Disease. *Journal of Chemical Ecology*, 1-11.
- Santos, E., & Invernizzi, C. (2020). OBSERVACIONES SOBRE LA BIOLOGIA DE *Epormenis cestri*, BERG, 1879 (HEMIPTERA, FLATIDAE). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 29(2), 176-182.
- Sharma, O., Raj, D., & Garg, R. (1986). Toxicity of nectar of tea (*Camellia thea*) to honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 25(2), 106-108 fecha de consulta 21/10/2021
- Sistema Nacional de Trazabilidad de los Productos Apícolas. (2021). *Informe de Datos del Registro Nacional de Propietarios de Colmenas*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/sinatpa-informe-datos-del-registro-nacional-propietarios-colmenas> fecha de consulta 12/9/2021
- Thrasylvoulou, A., Tananaki C, Goras G, Karazafiris E, Dimou M, Liolios V, Kanelis D & Gounari S. (2018) ..Legislation of honey criteria and standards, *Journal of Apicultural Research*, 57:1, 88-96
- Viotti, M. H., Juri, P., Lombide, P., Presentado, M. L., Verdes, J. M., Nogueira, E., ... & Pedrana, G. (2021). Increased Caspase-3 Immunoexpression and Morphology Alterations in Oenocytes and Trophocytes of *Apis mellifera* Larvae Induced by Toxic Secretion of *Epormenis cestri*. *Journal of Apicultural Science*, 65(1), 101-108.
- Yadav, S., Kumar, Y., & Jat, B. L. (2017). Honeybee: Diversity, castes and life cycle. In *Industrial Entomology* (pp. 5-34). Springer, Singapore.