



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# **Administración de polen polifloral como estrategia para mejorar la salud y productividad de colonias de abejas melíferas**

Natalia VIERA LÓPEZ

TESIS presentada como uno de los requisitos  
para obtener el título de Magíster en Ciencias  
Agrarias opción Ciencias Animales.

Diciembre 2021

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Lic. Biol. (Dra.) Ivanna Tomasco (presidenta), Ing. Agr. (Dr.) Yamandú Mendoza (vocal) y la Lic. Biol. (Dra.) Agostina Giacobino (Vocal), el 11 de marzo del 2022. Autor/a: Lic. Biol. Natalia Viera. Director Lic. Biol. (Dr.) Ciro Invernizzi, codirectora Lic. Biol. (Dra.) Belén Branchiccela.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Gracias, Ciro, Belén y Karina, por su paciencia infinita, por sus aportes, por siempre estar disponibles para mis dudas y por bancarme la cabeza con mis mil y un nervios.
- Gracias a los chiquilines de INIA que me dieron una mano enorme en los muestreos y a los gurises de la colonia que en mi estadía por el laboratorio me ayudaron un montón, con una enorme paciencia me enseñaron a usar cosas de laboratorio que yo con mi torpeza no sabía ni maniobrar. Gracias por las risas, los almuerzos y la compañía.
- Gracias amigos todes por estar ahí SIEMPRE presentes, por preguntarme cómo estaba, por hacerme reír cuando estaba desbordada, por brindarme un millón de cariño a distancia, gracias, Flor, Gabi, Joha, Sole, Feli, Estefa, Negra, Adri, Juancho, Lu y Claudita. Gracias, Juancho, por ser ese amigo bancador de cabeza, gracias por siempre preocuparte. Lu, a vos ya ni sé cómo agradecerle todo lo que has hecho, agradezco mil haberme reencontrado contigo en esta parte de nuestras vidas... ¡qué cosa difícil la maternidá y hacer una maestría!
- ¡A mi familia! Gracias por siempre siempre apoyarme en todas mis locuras, por ser esos que dicen “¿te puedo preguntar sobre cómo vas con la tesis?”. A papá y mamá, mil millones de gracias por cuidar a Juli, por aguantarme mis nervios y llantos. Por siempre tener un abrazo que todo lo calma para mí, y por las mil comidas que les robamos cuando la vida y la mapaternidad nos pasó por arriba. Y gracias a mí otra familia la de “los silvios”, gracias, Silvia y Hugo, por tanta ayuda, por hacerme de choferes, niñeros, y darme mil consejos y cariño también.
- Gracias a mi familia multiespecífica Rafa, Juli, Apolo y Zeus por darme los abrazos y ronroneos contenedores más lindos del mundo. Gracias, Rafa, por estar ahí siempre, por ser ese compañerazo de vida, por darle pelea junto a mí a los mil desafíos en los que me meto. Gracias, Juli, por acompañarme desde la panza en casi toda mi maestría, perdón por los nervios que te hice pasar cuando hice las qpcr, me calmaste esas noches de mil nervios con tus pequeñas pataditas, gracias por entender ahora (mil y una vez) que mami te tenía que dejar para escribir la tesis. Gracias por ser la pequeña más tierna del mundo mundial.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	III
RESUMEN .....	VI
SUMMARY .....	VII
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. IMPORTANCIA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. LA APICULTURA EN URUGUAY .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. PÉRDIDAS DE COLONIAS .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5. NUTRICIÓN DE LAS ABEJAS MELÍFERAS.....</b>	<b>6</b>
<b>1.6. SISTEMA INMUNE DE LAS ABEJAS MELÍFERAS.....</b>	<b>7</b>
<b>1.7. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1 - Efecto de la suplementación con polen polifloral sobre la fortaleza de las colonias, nivel de infección con <i>Nosema ceranae</i> y producción de miel. ....</b>	<b>11</b>
<b>2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. TORTAS DE POLEN POLIFLORAL.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3. UBICACIÓN DE LAS COLMENAS EN LA FORESTACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. TRATAMIENTOS NUTRICIONALES .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5. EVALUACIÓN DE LA FORTALEZA DE LAS COLMENAS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.6. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE INFECCIÓN POR <i>NOSEMA CERANAE</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>2.7. PRODUCCIÓN Y RESERVAS DE MIEL .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8. ORIGEN BOTÁNICO DEL POLEN COLECTADO POR LAS ABEJAS .....</b>	<b>16</b>
<b>2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>17</b>
<b>3. <u>RESULTADOS</u> .....</b>	<b>18</b>

3.1. IMPACTO DE LA SUPLEMENTACIÓN EN LA FORTALEZA DE LAS COLMENAS .....	18
3.2. RESERVAS Y PRODUCCIÓN DE MIEL.....	22
3.3. NIVEL DE INFECCIÓN CON <i>NOSEMA CERANAE</i> .....	24
3.4. ORIGEN BOTÁNICO DEL POLEN COLECTADO POR LAS ABEJAS Y ANÁLISIS DE LAS TORTAS DE POLEN POLIFLORAL.....	27
4. <u>DISCUSIÓN</u> .....	31
Capítulo 2- Efecto de la suplementación con polen polifloral en la expresión de genes vinculados al estado nutricional, longevidad e inmunidad de las abejas.....	37
5. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	38
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	38
5.2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE DE LAS ABEJAS .....	40
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	41
6. <u>RESULTADOS</u> .....	41
7. <u>DISCUSIÓN</u> .....	46
8. <u>APORTES DE LA TESIS</u> .....	49
9. <u>CONCLUSIONES</u> .....	53
10. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	54
11. <u>ANEXOS</u> .....	63
11.1. APÉNDICE 1: IMPLEMENTACION DE LA SUPLEMENTACION CON TORTAS DE POLEN POLIFLORAL, CÁLCULO COSTO Y BENEFICIO .....	63
11.2. APÉNDICE 2: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS EN EL ENSAYO 2.....	65
11.3. APÉNDICE 3: DOES POLYFLORAL POLLEN SUPPLEMENTATOPN IN HONEY BEES AFFECT THE IMMUNITY OF COLONIES UNDER NUTRITIONAL STRESS IN A <i>EUCALYPTUS GRANDIS</i> FOREST? .....	66

## **RESUMEN**

Entre las principales causas de pérdidas de colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera*) se encuentran la desnutrición y los problemas sanitarios. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con polen polifloral en la fortaleza, salud y productividad de colonias de abejas melíferas, antes de su traslado y durante su estadía en una plantación de *E. grandis*. A su vez, estudiar el efecto de esta suplementación sobre el estado inmunológico y nutricional de las abejas. Se prepararon tres grupos de colmenas experimentales con reinas hermanas. El grupo control A (20 colmenas) no recibió suplementación, el grupo B (20 colmenas) recibió suplementación hasta el momento del traslado de las colonias a las forestaciones de *E. grandis* y el grupo C (19 colmenas) recibió suplementación con polen polifloral cada quince días durante todo el experimento (previo al traslado y durante la estadía de las colonias en la forestación). Los resultados muestran que la suplementación con polen polifloral aumentó la sobrevivencia de las abejas adultas, aunque no se observó un efecto en cantidad de cría. En cuanto a la producción de miel existe una tendencia marginal a que las colonias suplementadas presenten mayor producción de miel, sin embargo. Los niveles de infección con *Nosema ceranae* en este estudio fueron notoriamente bajos y no se vieron afectados por la suplementación con polen polifloral. A nivel individual, se observó que la suplementación generó un aumento en el nivel de expresión del gen que codifica para la glucosa oxidasa, sugiriendo un refuerzo de la inmunidad social. También se observó un aumento en la expresión de vitelogenina, lo que coincide con el aumento en la sobrevivencia de las abejas, evidenciado a nivel colonial. Por otro lado, se observó una disminución en la expresión del gen que codifica para Birc5, gen que se encuentra involucrado en la inhibición de la apoptosis celular. Estos resultados confirman que la suplementación con polen polifloral es una estrategia que permite mitigar el debilitamiento de colmenas ubicadas en forestaciones de *E. grandis*. Esta tesis aporta al conocimiento de la compleja interacción entre dos de los principales factores asociados a las pérdidas de colmenas como lo son el estrés nutricional y sanitario.

Palabras clave: *Apis mellifera*, *Eucaliptus grandis*, *Nosema ceranae*, salud, nutrición

## **Polyfloral pollen administration as a strategy to improve the health and productivity of honey bee colonies.**

### **SUMMARY**

Among the main causes of honey bee (*Apis mellifera*) colony losses are malnutrition (associated with a decrease in pollen sources) and sanitary problems. Both causes affect Uruguayan colonies located in *Eucalyptus grandis* afforestations, where bees feed mainly on the pollen of these trees, which is of low nutritional quality. The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation with polyfloral pollen on the strength, health and productivity of honey bee colonies, before their relocation to, and during their stay in a *E. grandis* plantation. And, at the same time, to study the effect of this supplementation on bee immunological and nutritional condition. For this purpose, three groups of experimental hives with sister queens were prepared. Control group A (20 hives) received no supplementation, group B (20 hives) was supplemented with polyfloral pollen up to the moment of relocation to the *E. grandis* afforestation, and group C (19 hives) was supplemented with polyfloral pollen every two weeks during the whole experiment (before the relocation and during their stay in the afforestation). Results show that at the colonial level, supplementation increased the survival of adult bees, although no effect on brood quantity was observed. Supplemented colonies tended to have higher honey production, but this result was not significant. Infection levels with *Nosema ceranae* in this study were remarkably low and were not affected by supplementation. At the individual level, supplementation generated an increase in the expression level of the gene coding for glucose oxidase, suggesting a reinforcement of social immunity. An increase in the expression of vitellogenin was also observed, which coincides with the increase in bee survival, evidenced at the colony level. On the other hand, a decrease in the expression of the gene coding for Birc5, a gene involved in the inhibition of cell apoptosis, was observed. These results confirm that supplementation with polyfloral pollen is a strategy to mitigate the weakening of hives located in *E. grandis* afforestations. This thesis contributes to the search for strategies to mitigate the consequences of the interaction between both factors and their effects at the productive level.

Keywords: *Apis mellifera*, *Eucalyptus grandis*, *Nosema ceranae*, health, nutrition

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. IMPORTANCIA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS**

La abeja *Apis mellifera* es el principal organismo polinizador de cultivos silvestres y comerciales favoreciendo la fecundación y fructificación de diferentes especies vegetales y contribuyendo significativamente a la producción agrícola (Morse y Calderone, 2000; Gallai et al., 2009; Potts et al., 2016). La polinización por estos insectos beneficia a un 75 % de las especies de cultivos consumidos por los humanos (Klein et al., 2007). En Uruguay, la polinización por abejas melíferas aumenta la producción de algunos frutos de interés comercial, tales como manzana, girasol, tomates, pera, duraznos, zapallo kabutiá, frutilla, entre otros (Santos et al., 2009).

Además de su importancia como polinizadores, las abejas melíferas producen diferentes productos que el hombre ha utilizado con fines alimenticios, medicinales, e industriales, tales como miel, polen, propóleos, jalea real y cera, entre otros (Crane, 1990).

### **1.2. LA APICULTURA EN URUGUAY**

Las primeras colonias de abejas melíferas fueron introducidas en nuestro país en el departamento de Colonia en el año 1834 por Bernardino Rivadavia. A partir de ese año la apicultura comenzó a extenderse a lo largo de la zona sur y litoral del Uruguay. Hacia principios del 1900 se realizaron las primeras importaciones de colonias con cuadros móviles (en donde las abejas construyen los panales), modelo de colmena que permite que se coseche la miel sin destruir los panales y estos se vuelvan a reutilizar. Hacia el año 1929 se realizó la primera exportación de miel de Uruguay, gestionada por la Sección Crédito Rural del Banco de la República. En dicha transacción se vendieron aproximadamente 1000 kg a Inglaterra obteniéndose a cambio 42 libras esterlinas (CCU, 2021).

En el año 1934 se creó la Sociedad Apícola Uruguaya (SAU), gremial de la Asociación Rural del Uruguay (ARU). Esta sociedad, aún activa, es una asociación civil sin fines de lucro que nuclea a los apicultores a nivel nacional (web de SAU).



Actualmente Uruguay cuenta con unos 2500 apicultores que manejan unas 560.000 colonias (SINATPA, 2020). Desde el año 2010 al 2019 el número de propietarios de colonias ha disminuido en aproximadamente un 20 % (DIEA, 2020), registrándose en los últimos cinco años, una tasa de disminución anual de apicultores de un 5 % (OPYPA, 2020). Desde el año 2010 se ha producido un aumento en el número de colonias por propietario pasando de un promedio de 155 colonias, a un promedio de 255 colonias en 2019.

La apicultura se encuentra extendida en todo el territorio nacional, constatándose una mayor presencia en los departamentos del litoral. Aproximadamente el 48 % del total de las colonias del Uruguay se encuentran ubicadas en los departamentos de Soriano, Colonia, Paysandú y Río Negro.

El promedio de producción de miel para el período 2010-2019 fue de 20 kg por colmena (OPYPA, 2020). Dentro de las condiciones de producción, las variaciones pueden deberse a cambios en las condiciones ambientales y/o al uso inadecuado de agroquímicos que genera situaciones de debilitamiento y mortandad en las abejas.

Durante el año 2019 se exportaron aproximadamente 8 mil toneladas de miel y 2 mil kilos de propóleos. Esta miel fue exportada principalmente a España, Estados Unidos, Alemania y República Checa (MGAP, 2019). El récord de exportación en Uruguay, se dio en el año 2011 (14000 toneladas), generando divisas por 42 millones de dólares. Dado que la miel es un *commodity*, el comportamiento de los precios de exportación de Uruguay responde a la variación de precios del mercado internacional (OPYPA, 2020).

El sector apícola en nuestro país se ha enfrentado en los últimos años a varios problemas complejos vinculados al desarrollo de la actividad y a las exigencias externas para poder comercializar la miel. Dentro de los problemas intrínsecos, la apicultura enfrenta dificultades a nivel de la producción, problemas sanitarios y de intoxicaciones, así como también pérdidas importantes de colonias. Los factores extrínsecos que afectan a esta actividad implican principalmente exigencias del mercado, fluctuaciones de oferta y demanda de miel a nivel mundial y oscilaciones de

precios. Por otra parte, el rendimiento por colmena a nivel nacional ha disminuido de manera significativa determinando, en conjunción con los precios bajos, problemas de rentabilidad. El principal factor asociado a esta baja en la producción son los cambios en las condiciones ambientales de los últimos años (OPYPA, 2020).

Recientemente, el avance de la agricultura ha motivado a algunos apicultores a realizar una apicultura trashumante, trasladando sus colonias a finales del verano hacia forestaciones de *Eucalyptus grandis* ubicadas al norte del país (Invernizzi et al., 2011, Branchiccela et al., 2019). Esta especie de *Eucalyptus* florece desde fines de febrero a mayo, mostrando un enorme potencial nectarífero y polinífero, lo que permite extender la temporada productiva de primavera-verano. Sin embargo, el polen de *E. grandis* disminuye su porcentaje de proteína bruta durante el período de floración (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019), presenta un bajo contenido de lípidos (Manning, 2001; Branchiccela et al., 2019) además de ser un polen deficiente en el aminoácido esencial isoleucina (de Groot, 1953; Somerville, 2001; Somerville y Nicol, 2006; Branchiccela et al., 2019).

### **1.3. PÉRDIDAS DE COLONIAS**

En las últimas dos décadas se han reportado importantes pérdidas de colonias de abejas melíferas en diversas partes del mundo (Stokstad, 2007; Ellis et al., 2010; Potts et al., 2010; vanEngelsdorp y Meixner, 2010, Requier et al., 2018). Estas pérdidas han ocasionado grandes perjuicios económicos, tanto a productores apícolas como a la actividad agrícola asociada a la polinización (Potts et al., 2010). En muchos países se han puesto en marcha programas de monitoreo para estimar las pérdidas de colonias. En nuestra región, la Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas (SOLATINA) está llevando adelante este monitoreo (Requier et al., 2018). Los resultados muestran que la mortalidad de las colonias está influenciada por múltiples factores bióticos, ambientales y de manejo apícola. A partir de estas encuestas se determinó que el manejo apícola es sumamente importante en la prevención de la pérdida de las colonias. De esta manera, los apicultores que visitan asiduamente sus apiarios recambian reinas, alimentan las colonias y controlan la varroosis, consiguen

una menor mortalidad de colonias en comparación a los apicultores que atienden sus apiarios con visitas más esporádicas.

En los últimos años, el uso intensivo de la tierra y las grandes extensiones de monocultivos han llevado a que los paisajes se vuelvan homogéneos, transformándose en ambientes con pocos recursos para las abejas (Naug y Gibbs, 2009). De esta manera, una reducción en la abundancia, calidad y diversidad de polen puede causar en las abejas deficiencias nutricionales, afectando su fisiología, desarrollo social e inmunocompetencia (van Dooremalen et al., 2013). Por consiguiente, el cambio climático, los problemas sanitarios (Higes et al., 2006; Higes et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2010; Dainat et al., 2012), nutricionales (Alaux et al., 2010) y de intoxicación con pesticidas (Alaux et al., 2010; van Engelsdorp et al., 2010; Vidau et al., 2011), se encuentran dentro de los factores que generan pérdidas de colonias. Esta tesis se enfoca en evaluar la suplementación con polen polifloral como una estrategia para mitigar el estrés nutricional y los problemas sanitarios que enfrentan las abejas que son trasladadas a forestaciones de *E. grandis*.

#### **1.4. ENFERMEDADES QUE AFECTAN LAS ABEJAS MELÍFERAS**

Las abejas melíferas son organismos eusociales, beneficiándose de una cooperación que aumenta la eficiencia en el cuidado de las crías, la búsqueda de alimentos o las defensas frente a depredadores (Winston, 1987). Sin embargo, esta vida en grupo tiene sus desventajas. Dada la densidad y el contacto frecuente entre los individuos en la colonia, las enfermedades infecciosas pueden propagarse fácilmente. Además, existe una cercanía parental entre los integrantes de la colonia, lo que implica que sean susceptibles a las mismas infecciones (Cremer et al., 2007).

Dentro de las plagas y patógenos de mayor relevancia apícola se destaca el ácaro *Varroa destructor*, el cual es la principal amenaza para las abejas (Rosenkrantz et al., 2010), los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Higes et al., 2008), más de 70 virus (Beaurepaire et al., 2020), y las bacterias *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*, agentes causales de la *Loque Americana* y *Loque europea*, respectivamente

(Genersch et al., 2006). Todos estos parásitos y patógenos se encuentran presentes en Uruguay y la mayoría de ellos están ampliamente distribuidos (Anido et al., 2016).

#### **1.4.1 Nosemosis**

La nosemosis es una enfermedad producida por los microsporidios *N. apis* y *N. ceranae* (recientemente Tokarev et al., 2020 sugieren denominar al género como *Vairimorpha*). Ambas especies se reproducen en las células epiteliales del ventrículo de las abejas, afectando las funciones digestivas, produciendo desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad (Higes et al., 2008; Mayack y Naug, 2009; Genersch et al., 2010). A su vez *N. ceranae*, a diferencia de *N. apis*, es capaz de suprimir la respuesta inmune de las abejas (Antúnez et al., 2009). En particular, *N. ceranae* es capaz de inhibir la apoptosis o muerte celular programada, proceso que favorece el éxito reproductivo del microsporidio (Martín-Hernández et al., 2018).

La transmisión de *Nosema* spp. se da a través de la ingestión de esporas por medio de agua o alimentos contaminados, mediante el intercambio de alimentos entre las abejas o cuando realizan sus tareas de limpieza (McGowan et al., 2016). Secundariamente, el microsporidio puede ser contagiado por transmisión sexual, por lo tanto, se considera la época reproductiva como otro momento de infección (Roberts et al., 2015).

Una vez que las esporas arriban al ventrículo, germinan ingresando a las células epiteliales para multiplicarse y finalmente producir esporas que se volverán a esparcir a la luz intestinal y reinfectar células vecinas. A pocos días de la infección, en el intestino de una abeja se pueden encontrar miles de nuevas esporas. Las esporas eliminadas en las heces se convierten a su vez en nuevas fuentes de infección en las colonias (Chen et al., 2008), siendo suficiente 1,28 esporas para desencadenar la infección (McGowan et al., 2016).

En Uruguay *N. ceranae* se encuentra presente desde al menos 1990 (Invernizzi et al., 2009), siendo esta especie la predominante para nuestro país (Anido et al., 2016). Se encuentra ampliamente distribuida en todo el territorio nacional (Anido et al., 2016). Esta prevalencia se ve incrementada cuando las colonias son trasladadas a forestaciones de *E. grandis* al norte de nuestro país. Una vez instaladas las colonias en

las plantaciones, se infectan con altos niveles de este microsporidio (Invernizzi et al., 2011; Mendoza et al., 2012, Mendoza et al., 2014a, Mendoza et al., 2014b, Branchiccela et al., 2019). Por otro lado, *Nosema apis* se ha detectado de forma esporádica.

## **1.5. NUTRICIÓN DE LAS ABEJAS MELÍFERAS**

Las abejas se alimentan de miel y néctar que son la principal fuente de carbohidratos (Haydak, 1970). Estos organismos colectan el néctar de las plantas y lo transportan a la colmena donde es almacenado y transformado en miel (Doner, 1977).

Por otro lado, las abejas también se alimentan de polen, fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales (Brodschneider y Crailsheim, 2010). En particular, el polen es la fuente de diez aminoácidos esenciales para el desarrollo de las abejas. El valor nutritivo del polen varía considerablemente entre plantas y su calidad se evalúa con base en sus niveles de proteína cruda y en la composición de nutrientes (De Groot, 1953). Adicionalmente, la abundancia relativa de aminoácidos esenciales y grasas son también factores relevantes (Nicolson, 2011; Di Pasquale et al., 2013).

La sobrevivencia y producción colonial depende directamente de la calidad (composición química) y de la cantidad total de nutrientes consumidos (Simpson y Raubenheimer, 2012).

Los carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales disponibles para las abejas melíferas influyen en la cantidad de la progenie producida, la longevidad y salud de los adultos, y de la supervivencia y productividad de la colonia (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Las colonias que se ven enfrentadas a la falta de nutrientes esenciales cesan su producción de cría y es posible que no sobrevivan de no obtener dichos nutrientes (Brodschneider y Crailsheim, 2010; Huang, 2012). Por otro lado, la abundancia y la diversidad de los recursos botánicos también impacta en el sistema inmune de la abeja y en la composición de la microbiota intestinal (Alaux et al., 2010; Branchiccela et al., 2020, Castelli et al., 2020).

El consumo de polen por parte de las abejas varía a lo largo de su ciclo de vida. Esta variación va acompañada por cambios en la fisiología asociados a la producción de

enzimas con actividad proteolítica y a cambios en la anatomía vinculados al desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y cuerpos grasos (Moritz y Crailsheim, 1987).

Los cuerpos grasos son la principal reserva de proteínas y lípidos en las abejas. Los aminoácidos absorbidos luego de la digestión del polen se almacenan en estos tejidos de reserva (Fluri et al., 1982). En climas templados la composición de estos cuerpos grasos varía a lo largo del año, aumentando su contenido de lípidos en primavera-verano (Amdam y Omholt, 2003). Las proteínas son transportadas desde los cuerpos grasos hacia las glándulas hipofaríngeas, a través de la Vitelogenina (Amdam et al., 2010). Esta fosfoglicolipoproteína tiene como función principal ser el transportador de nutrientes por la hemolinfa (Fluri et al., 1982). Un aumento de proteínas determina un aumento de la concentración de Vitelogenina (Amdam et al., 2012). Una vez que estas proteínas llegan a las glándulas hipofaríngeas, se produce la síntesis de jalea real (Crailsheim, 1992), una sustancia producida por las abejas nodrizas para alimentar mediante trofalaxis a larvas, reina, obreras y zánganos (Crailsheim, 1992). La trofalaxis es la transferencia social de alimentos desde un individuo adulto hacia otro individuo adulto o larva de la colmena (Crailsheim, 1992, 1998).

Brodschneider y Crailsheim (2010) proponen tres niveles de nutrición: de la colonia, de abejas adultas y de larvas. Desórdenes producidos en niveles inferiores afectará los siguientes niveles y viceversa. Estos niveles nutricionales se encuentran conectados mediante la trofalaxis (Brodschneider & Crailsheim, 2010).

Larvas y adultos presentan una gran dependencia de las reservas alimenticias de la colonia, las abejas adultas pueden adaptar su actividad de pecoreo o su estrategia de cuidados de acuerdo a las necesidades de carbohidratos y proteínas allí existentes (Schmickl & Crailsheim, 2004). Por ende, los requerimientos nutricionales a nivel individual generan un gran impacto sobre el desarrollo y comportamiento de la colonia.

## **1.6. SISTEMA INMUNE DE LAS ABEJAS MELÍFERAS**

Para enfrentar los diferentes parásitos y patógenos, las abejas melíferas presentan diferentes mecanismos de inmunidad a nivel social e individual (Cremer et al., 2007; Evans et al., 2006).

### **1.6.1. Inmunidad social**

La inmunidad social se basa en la acción colectiva de los individuos de la colonia con el fin de evitar, controlar y eliminar las infecciones (Cremer et al., 2007). La invasión de un parásito a una colonia consta de varios pasos: el parásito debe alcanzar a la colonia, ingresar, establecerse y posteriormente propagarse entre los miembros del grupo. Los insectos sociales desencadenan mecanismos de defensa social en cada una de estas etapas del proceso. Las abejas guardianas en la entrada de la colmena regulan quién entra a la colonia y quién no, atacando y excluyendo a los individuos infectados. En el caso que este primer paso de protección falle, se desencadenan comportamientos como el *grooming* y la higiene del nido, entre otros. Las abejas melíferas también colectan del ambiente resinas las cuales son utilizadas para la desinfección de toda la colmena (Cremer et al., 2007; Gliński y Jarosz, 1995).

Muchas veces, a pesar de las medidas de precaución, un parásito puede llegar a establecerse en el nido. En ese caso, se despliegan mecanismos para evitar que el parásito se propague entre los miembros del grupo. Dentro de estos comportamientos, se destaca la protección de la reina y la remoción de la cría infectada por parte de las nodrizas (comportamiento higiénico) (Simone-Finstrom et al., 2014).

En las abejas melíferas existen además sustancias protectoras, como por ejemplo los péptidos antimicrobianos en la miel, que son transferidos directamente a la cría a través de la alimentación (Cremer et al., 2007).

### **1.6.2. Inmunidad humoral y celular**

Los insectos presentan diversos mecanismos a nivel individual para combatir la infección con patógenos, incluyendo barreras físicas como el exoesqueleto o la membrana peritrófica, la inmunidad humoral y celular (Evans et al., 2006).

Las defensas humorales incluyen la producción de péptidos antimicrobianos tales como la defensina (Casteels-Josson et al., 1994), abaecina (Casteels et al., 1990), himenoptecina (Casteels et al., 1993) y apidecina (Casteels et al., 1989). Este tipo de defensas involucran también enzimas tales como la lisozima encargada de hidrolizar las paredes bacterianas (Lavine y Strand, 2002), la fenoloxidasa la cual participa en el proceso de formación de la melanina (Nappi y Christensen, 2005) y la glucosa oxidasa, enzima que presenta actividad antimicrobiana y antifúngica (Wong et al., 2008).

La respuesta inmune celular incluye la acción de diferentes hemocitos, los cuales llevan a cabo procesos de fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (Strand, 2008).

### **1.7. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA**

La intensificación de la producción agrícola ha deteriorado ampliamente las zonas apícolas. Este hecho, junto con el aumento en las pérdidas de colonias y la disminución en el rendimiento productivo, ha estimulado a los apicultores a buscar alternativas para mantener o aumentar la producción de miel. En este marco, se ha generado un incremento en la movilidad de colonias trasladadas a las forestaciones de *E. grandis* en febrero-mayo. En esta etapa del año la oferta floral disminuye significativamente en la mayoría de los ambientes del país. Si bien en las forestaciones de *E. grandis* las colonias aumentan mucho su producción, hacia el final de la floración se debilitan sensiblemente corriendo el riesgo de no sobrevivir el invierno. El debilitamiento podría deberse a un aumento en la infección con *N. ceranae* (Mendoza et al., 2013, 2012), al estrés de someterse a una intensa actividad en un momento del año en que la colmena debería prepararse para invernar y a la desnutrición de las abejas debido a la disponibilidad de una fuente principal de polen (Invernizzi et al., 2011). Las pérdidas de las colonias pueden ser de una magnitud tal que el beneficio económico del traslado a los montes de *E. grandis* puede verse muy reducido.

Estudios previos demostraron que, en estas condiciones, la disponibilidad de polen polifloral reduce la infección por *N. ceranae* (Branchiccela et al., 2019; Invernizzi et al., 2011). Además, la suplementación de las colonias con tortas de polen polifloral aumenta la cantidad de abejas y de cría (Branchiccela et al., 2019). Sin embargo, en estos ensayos la suplementación no tuvo consecuencias en la producción de miel. Esto



podría deberse a que las larvas alimentadas durante la suplementación con polen polifloral, comenzaron a pecorear a los 30-35 días después de ubicadas las colonias en el monocultivo, momento en el cual la disponibilidad de néctar ya había disminuido (Belén Branchiccela, comunicación personal, junio 2020).

Esta propuesta está dirigida a evaluar el momento oportuno en que las colonias ubicadas en plantaciones de *E. grandis* deben ser suplementadas con polen polifloral, para mejorar su fortaleza, salud y productividad. A la vez, se pretende estudiar los mecanismos fisiológicos que se desencadenan como consecuencia de dicha suplementación.

## **1.8. HIPÓTESIS**

La suplementación de colonias de abejas melíferas con polen polifloral antes de su traslado y/o durante su estadía en plantaciones de *E. grandis* afecta el estado sanitario, nutricional e inmunológico de las abejas a nivel individual, lo que se ve reflejado en la fortaleza y productividad a nivel colonial.

### **1.8.1. Predicciones**

I. Las colonias suplementadas con polen polifloral presentarán menor nivel de infección con *Nosema ceranae*.

II. Las colonias suplementadas con polen polifloral tendrán un mayor número de individuos adultos y de cría que redundará en un aumento en la producción de miel.

III. Las colonias suplementadas con polen polifloral presentarán una mayor expresión de los genes relacionados a la inmunidad (himenoptecina, profenol oxidasa y glucosa oxidasa), una menor expresión del gen inhibidor de la apoptosis (deterina), y una mayor expresión del gen vinculado al estado nutricional, longevidad y estrés oxidativo de las abejas (vitelogenina).

## **1.9. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la suplementación con polen polifloral en la fortaleza, salud y productividad de colonias de abejas melíferas antes de su traslado y durante su estadía en una plantación de *E. grandis*. A su vez, estudiar el efecto de esta suplementación sobre el estado inmunológico y nutricional de las abejas.

### **1.9.1. Objetivos específicos**

- A) Analizar el efecto del suministro de polen polifloral sobre la población de las colonias y en la producción de miel.
- B) Determinar el efecto del suministro de polen polifloral sobre los niveles de infección con *N. ceranae*.
- C) Analizar el efecto del suministro polen polifloral a nivel colonial sobre la expresión de genes vinculados al estado nutricional de la abeja, genes asociados a la respuesta inmune humoral, celular y social y a la apoptosis.

## **CAPÍTULO 1 - Efecto de la suplementación con polen polifloral sobre la fortaleza de las colonias, nivel de infección con *Nosema ceranae* y producción de miel.**

En los últimos años los apicultores han buscado alternativas para mantener o aumentar su producción de miel (Invernizzi et al., 2011), ya que se ha visto afectada por diversos motivos como disminución de disponibilidad de fuentes de néctar, cambio climático y despoblación y pérdidas de colmenas (Higes et al., 2006; Higes et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2010; Dainat et al., 2012). Una de las estrategias adoptadas por los productores es el traslado de colonias a forestaciones de *E. grandis* durante la floración de estos árboles en los meses de febrero-mayo (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019). En estas forestaciones es posible obtener buenas cosechas de miel. Sin embargo, sobre el final de la floración las

colonias suelen quedar despobladas y presentarse alta mortalidad colonial. Este debilitamiento de las colonias puede deberse a un aumento en la infección con *N. ceranae* (Invernizzi et al., 2011; Mendoza et al., 2012, Mendoza et al., 2014a, Mendoza et al., 2014b, Branchiccela et al., 2019), al estrés de realizar una intensa actividad en un momento en que la debería prepararse para invernar y a la desnutrición de las abejas debido a la disponibilidad de una fuente principal de polen con bajo valor nutritivo (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019).

Este estudio está dirigido a determinar cómo la suplementación con polen polifloral de colmenas emplazadas en una forestación de *E. grandis* repercute en la fortaleza, la infección por *N. ceranae* y la producción de miel.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Durante la primavera-verano de la temporada 2017-2018 se prepararon colmenas con reinas hermanas en la Estación Experimental INIA La Estanzuela (departamento de Colonia). Todas las colmenas se trataron al inicio del experimento con un acaricida orgánico (ácido oxálico en tiras de cartón) para disminuir la infestación por el ácaro *V. destructor*. Previo al comienzo del ensayo, las colmenas se estandarizaron en 8 cuadros de cría, un cuadro con una lámina de cera estampada y un cuadro con miel. Posteriormente se dividieron en tres grupos según el tratamiento a recibir: el grupo A (control) formado por 20 colmenas que no recibieron suplementación de polen, el grupo B formado por 20 colmenas suplementadas con polen polifloral previo al traslado a una forestación de *E. grandis* y el grupo C formado por 19 colmenas suplementadas con polen polifloral previo al traslado a una forestación de *E. grandis* y durante todo el período de permanencia en la forestación.

Un mes después de iniciados los tratamientos nutricionales, los tres grupos de colmenas se trasladaron a una forestación de *E. grandis* en el departamento de Rivera (-31.347, -55.714). Estas colmenas se mantuvieron en la forestación durante aproximadamente dos meses y medio (Figura 1).

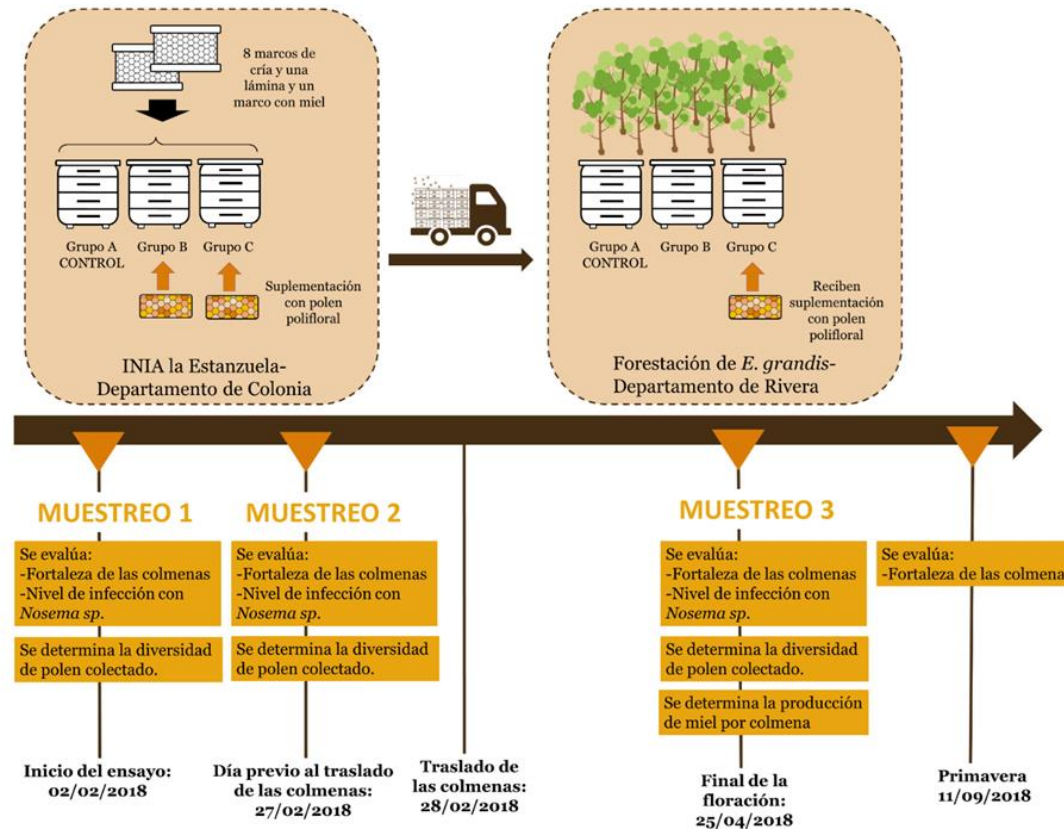


Figura1. Esquema representativo de las actividades del primer ensayo. Se indican los tratamientos realizados así como las variables analizadas a lo largo del tiempo.

Al inicio del ensayo (en el mes de febrero), el día previo del traslado a la forestación (finales de febrero), y al finalizar la floración de los eucaliptos (principio de mayo) se evaluó el tamaño de las colonias y sus reservas de polen y se tomaron muestras de abejas para el análisis del nivel de infección con *N. ceranae* (según se describe en las secciones 2.6); a su vez, se tomaron muestras de abejas de 10 días de edad pertenecientes a los grupos experimentales A y C para determinar el nivel de infección con *N. ceranae* mediante técnicas moleculares (el procedimiento se detalla en el capítulo 2). Por otro lado, con el objetivo de evaluar el efecto de la suplementación con polen polifloral a mediano plazo, al inicio de la primavera siguiente, se estimó la población de abejas adultas.

## **2.2. TORTAS DE POLEN POLIFLORAL**

Se elaboraron tortas de polen polifloral a partir de polen ensilado y jarabe de sacarosa al 50 %, mezclando 9 kg de polen con 600 cc de jarabe (Branchiccela et al., 2019). Para extraer el polen de las celdas se empleó un equipo específico (Wilara XCDS, Lituania). Las tortas de 500 g se almacenaron a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas.

## **2.3. UBICACIÓN DE LAS COLMENAS EN LA FORESTACIÓN**

Las colmenas se trasladaron a una forestación de *E. grandis* ubicada en una zona cercana a la localidad de Tranqueras, en el departamento de Rivera (-31.347, -55.714). El traslado se realizó por la noche con las colmenas cubiertas por una malla para impedir la pérdida de abejas, y se descargaron en la mañana siguiente. Las colmenas se dispusieron en forma circular con el fin de reducir al mínimo la deriva de abejas entre las colmenas de los diferentes grupos.

Con base en el procesamiento digital e interpretación de imágenes Sentinel 2 (2017 y 2018), la zona donde se encuentra la forestación, presenta vastas áreas forestadas de *Eucalyptus* spp., *Pinus* sp., *Salix* sp. y *Populus* sp., totalizando una superficie forestada en el departamento de aproximadamente 136 mil hectáreas, lo que corresponde a un 14% de la superficie departamental (MGAP, 2018).

#### **2.4. TRATAMIENTOS NUTRICIONALES**

Las colmenas pertenecientes al grupo A no recibieron tortas de polen (grupo control), las colmenas del grupo B se suplementaron con 500 g de torta cada 15 días (total: 1 kg), durante el mes previo al traslado a la forestación, y las colmenas del grupo C se suplementaron con 500 g de torta polifloral cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación (total: 2 kg).

#### **2.5. EVALUACIÓN DE LA FORTALEZA DE LAS COLMENAS**

Se estimó subjetivamente la fortaleza de las colmenas al inicio del ensayo, el día previo a ser trasladadas a la forestación y previo a retirarlas de la forestación sobre el final de la floración.

Para esto, dos observadores experimentados estimaron visualmente la población de abejas y el área de cría. La estimación de la población adulta de abejas se calculó según una modificación del método sugerido en Delaplane et al., 2013. Esta modificación se realizó considerando el manejo de abejas africanizadas, y ha sido ampliamente utilizado y validado por nuestro grupo de investigación (Invernizzi et al., 2011; Mendoza et al., 2013; Branchiccela et al., 2019 y 2021). La cantidad de abejas adultas se estimó como el número de “calles” (espacio entre dos cuadros) cubiertas por abejas (cada calle con abejas equivale a dos caras de cuadro cubiertas por abejas). Considerando el área de cada cara de cuadro y la cantidad de abejas que ocupan dicha área se estimó el número de abejas de la colmena (Delaplane et al., 2013). En el caso de la cría, se estimó visualmente el porcentaje de cara de cuadro cubierto por cría. Considerando el área de cada cara de cuadro y la cantidad de celdas en dicha área, se calculó la cantidad de cría por colmena (Delaplane et al., 2013).

#### **2.6. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE INFECCIÓN POR NOSEMA CERANAE**

El nivel de infección con *N. ceranae* se determinó mediante microscopía óptica y mediante PCR en tiempo real. Para la determinación mediante microscopía, se homogeneizó el abdomen de 60 abejas colectadas del alza melaria con 60 ml de agua destilada estéril a máxima potencia por 120 segundos en un *Stomacher* (Seaward).

Posteriormente se realizó el recuento de esporas en un microscopio óptico, utilizando una cámara de Neubauer (Fries et al., 2013).

Para la determinación del nivel de infección mediante PCR en tiempo real se utilizaron abejas de diez días de edad (marcando abejas recién emergidas de las colmenas) pertenecientes a colmenas de los grupos A y C. Para esto se homogeneizó cada abeja individualmente en 600 µl de buffer de lisis (Qiagen), utilizando 9 abejas por colmena (3 colmenas del grupo A y 3 colmenas del grupo C, total 27 abejas por grupo). La extracción de ARN se realizó empleando el *kit RNeasy Plus* (Qiagen), el ADN coextraído se digirió con DNAsa I (Invitrogen) y el ARN obtenido se retrotranscribió a ADNc empleando el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El nivel de infección de *N. ceranae* por abeja se determinó mediante qPCR empleando cebadores específicos para el gen que codifica para la proteína 3 del filamento polar de este microorganismo (PTP3, Xu y Weiss, 2005). Las reacciones de PCR consistieron en 10 µl de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,3 µM de cada cebador (tabla 1) y 2 µl de cDNA en un volumen final de 20 µl.

## **2.7. PRODUCCIÓN Y RESERVAS DE MIEL**

Al final de la floración del *E. grandis* (principios del mes de mayo) se estimó la cantidad de miel presente en la cámara de cría y se pesó la cantidad de miel almacenada en las alzas melarias. La estimación de la miel almacenada en la cámara de cría se realizó mediante inspección visual. Cada observador estimó el porcentaje de la superficie de cara de cuadro ocupada por miel, luego se calculó su peso de acuerdo a Delaplane et al. (2013). La cantidad de miel en las alzas melarias se determinó como la diferencia de peso de los panales antes y después de la extracción de la miel que contenían.

## **2.8. ORIGEN BOTÁNICO DEL POLEN COLECTADO POR LAS ABEJAS**

Se colectó el polen superficial de al menos 60 celdas de cada colmena. A continuación, se contabilizó la cantidad de granos de polen de las distintas especies presentes en la

muestra de polen ensilado, empleando un microscopio de 400 aumentos y comparando con una colección de referencia (Louveax et al., 1978). A partir del análisis se obtuvo el porcentaje de cada especie botánica en relación con el total de granos de polen identificados.

El análisis para determinar el origen botánico de los diferentes pólenes fue realizado por la MSc. Estela Santos en la Facultad de Ciencias, Udelar.

## 2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objetivo de analizar el efecto de la suplementación con polen polifloral en la fortaleza de las colmenas, en su producción de miel y en sus niveles de infección con *Nosema ceranae*, se evaluó si los datos cumplían con los supuestos de estadística paramétrica empleando los tests de normalidad y homogeneidad de varianza de Shapiro y de Levene, respectivamente (paquetes {nortest} y {car}) (R Studio Team, 2016). Para la población adulta dado que los datos no cumplieron con los supuestos de la estadística paramétrica, las diferencias entre grupos se analizaron mediante el test de Kruskal Wallis y posteriormente el test de Wilcox (paquete {agricolae}) (R Studio Team, 2016). Se consideró un nivel de confianza del 95%.

Por otro lado, con el objetivo de comparar la diversidad de polen colectado por las colmenas, se calculó el índice de diversidad alfa de Shannon-Weaver por grupo experimental en cada uno de los muestreos empleando la siguiente fórmula (Wilhm y Dorris, 1968):

$$H' = - \sum \frac{N_i}{N} \log_2 \frac{N_i}{N}$$

En donde:

H': valor del índice de diversidad.

N<sub>i</sub>: el número de granos de polen en el i-ésimo tipo.

N: número de individuos de todos los tipos.

La comparación entre grupos se realizó según el procedimiento descrito previamente.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. IMPACTO DE LA SUPLEMENTACIÓN EN LA FORTALEZA DE LAS COLMENAS

Al inicio del ensayo todas las colmenas presentaron similar población de abejas adultas (Wilcoxon test,  $p_{A-B} = 0,2$ ,  $p_{A-C} = 1,0$ ,  $p_{C-B} = 1,0$ : A = grupo control, colmenas no suplementadas, B = colmenas suplementadas hasta antes del traslado, C = colmenas suplementadas en todo el ensayo). Luego de un mes de aplicados los diferentes tratamientos, se observó que las colmenas suplementadas con tortas de polen polifloral (grupos B y C) presentaron diferencias marginales significativas con una mayor población de abejas en comparación a las colmenas del grupo control (A) (Wilcoxon test,  $p_{A-B} = 0,06$ ,  $p_{A-C} = 0,08$ ,  $p_{B-C} = 1,0$ ). En esas condiciones, las colmenas se trasladaron a la forestación de *E. grandis* y estos efectos se mantuvieron hasta el final del período de la floración en ambos grupos suplementados (B y C) mostrando esta vez diferencias significativas (Wilcoxon test,  $p_{A-B} = 0,02$ ,  $p_{A-C} = 0,05$ ,  $p_{B-C} = 1,0$ ) (Figura 2). En la primavera, se observa que las colmenas que habían sido suplementadas (grupos B y C) presentaron mayor cantidad de abejas adultas que las colmenas del grupo control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Wilcoxon test,  $p_{A-B} = 1,0$ ,  $p_{A-C} = 1,0$ ,  $p_{B-C} = 1,0$ ) (Figura 2).

A lo largo del tiempo, desde el inicio del ensayo hasta el final de la floración de los eucaliptos, se observa que la población de abejas disminuyó significativamente en el grupo control (grupo A) pero no así en los grupos suplementados (Grupos B y C) (Wilcoxon, grupo A  $p_{\text{Muestreo 1-3}} = 0,04$ , grupo B  $p_{\text{Muestreo 1-3}} = 1,000$  y grupo C  $p_{\text{Muestreo 1-3}} = 1,000$ ). Por otra parte, desde el inicio del ensayo hasta la primavera se observa una disminución de la población de abejas en todos los grupos a lo largo del tiempo (Wilcoxon, Grupo A  $p_{\text{Muestreo 1-4}} = 0,001$ , Grupo B  $p_{\text{Muestreo 2-4}} < 0,001$ , Grupo C  $p_{\text{Muestreo 3-4}} = 0,001$ ) (Figura 2).

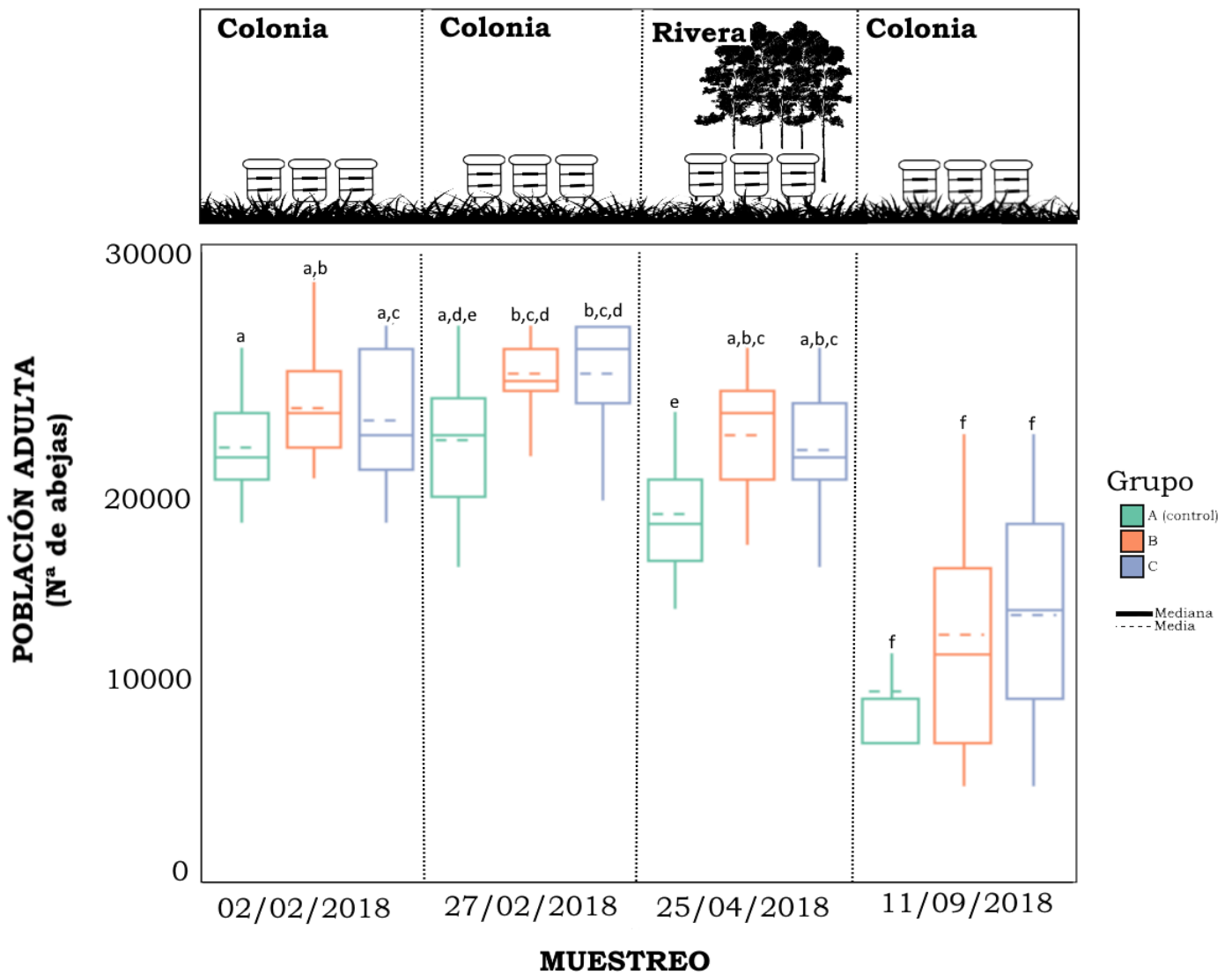


Figura 2. Población de abejas en función de los tratamientos y a lo largo del tiempo. Se indica en la parte superior la localización geográfica de los grupos experimentales en cada uno de los muestreos. Grupo A = colmenas que no recibieron tortas de polen (control), Grupo B = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado a la forestación, Grupo C = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la forestación. Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de Kruskal Wallis y Wilcox *a posteriori*.

Los tres grupos de colmenas presentaron similar cantidad de cría al inicio del ensayo (ANOVA,  $p = 0,656$ ), mientras que en los muestreos 2 y 3 si bien se observa una mayor población de cría en las colmenas suplementadas, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (ANOVA,  $p_{\text{muestreo2}} = 0,424$ ,  $p_{\text{muestreo3}} = 0,265$ ) (Figura 3). De forma similar a la población de abejas, la cantidad de cría disminuyó significativamente en el tiempo (desde el inicio del ensayo hacia el final del mismo) en todas las colmenas (Scheffé, grupo A  $p_{\text{Muestreo 1-3}} < 0,001$ , Grupo B  $p_{\text{Muestreo 1-3}} < 0,001$  y grupo C  $p_{\text{Muestreo 1-3}} < 0,001$ ) (Fig. 3).

El porcentaje de pérdida de colmenas en el transcurso del ensayo (desde que se dividieron los tres grupos experimentales hasta que se retiraron las colmenas de la forestación) fue de un 10, 30 y 16 % para los grupos A, B y C, respectivamente. Desde que se retiraron las colmenas de la forestación a finales de otoño hasta la primavera siguiente el porcentaje de pérdida de colmenas fue de un 21% para el grupo control, un 0% para el grupo suplementado hasta antes del traslado y un 7% para el grupo suplementado a lo largo de todo el ensayo. En ninguno de los casos hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $\chi^2$ ,  $p \geq 0,05$ )

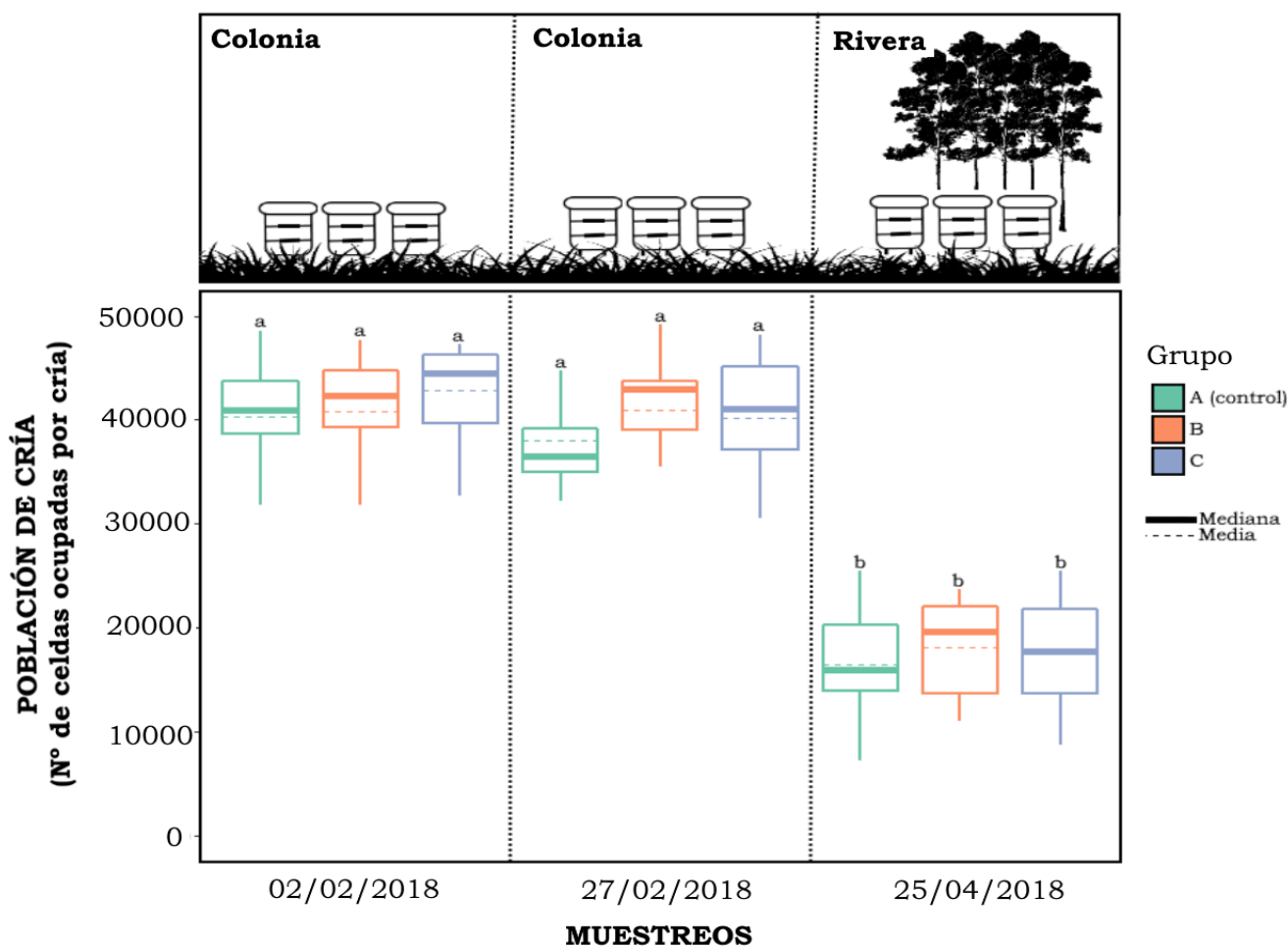


Figura 3. Población de cría por colmena en función de los tratamientos y a lo largo del tiempo. Se indica en la parte superior la localización de los grupos experimentales en cada uno de los muestreos. Grupo A = colmenas que no recibieron tortas de polen (control), Grupo B = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado a la forestación, Grupo C = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la forestación. Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de ANOVA y Scheffé *a posteriori*.

### 3.2. RESERVAS Y PRODUCCIÓN DE MIEL

Una vez finalizada la floración del *E. grandis* se determinó la cantidad de miel almacenada en la cámara de cría y en las alzas melarias. No se observaron diferencias en la cantidad de miel almacenada ni en la cámara de cría ni en las alzas melarias en los tres grupos de colmenas analizados (ANOVA,  $p_{\text{Cámara de cría}} = 0,453$ ,  $p_{\text{Alza melaria}} = 0,168$ ) (Figura 4 y 5).

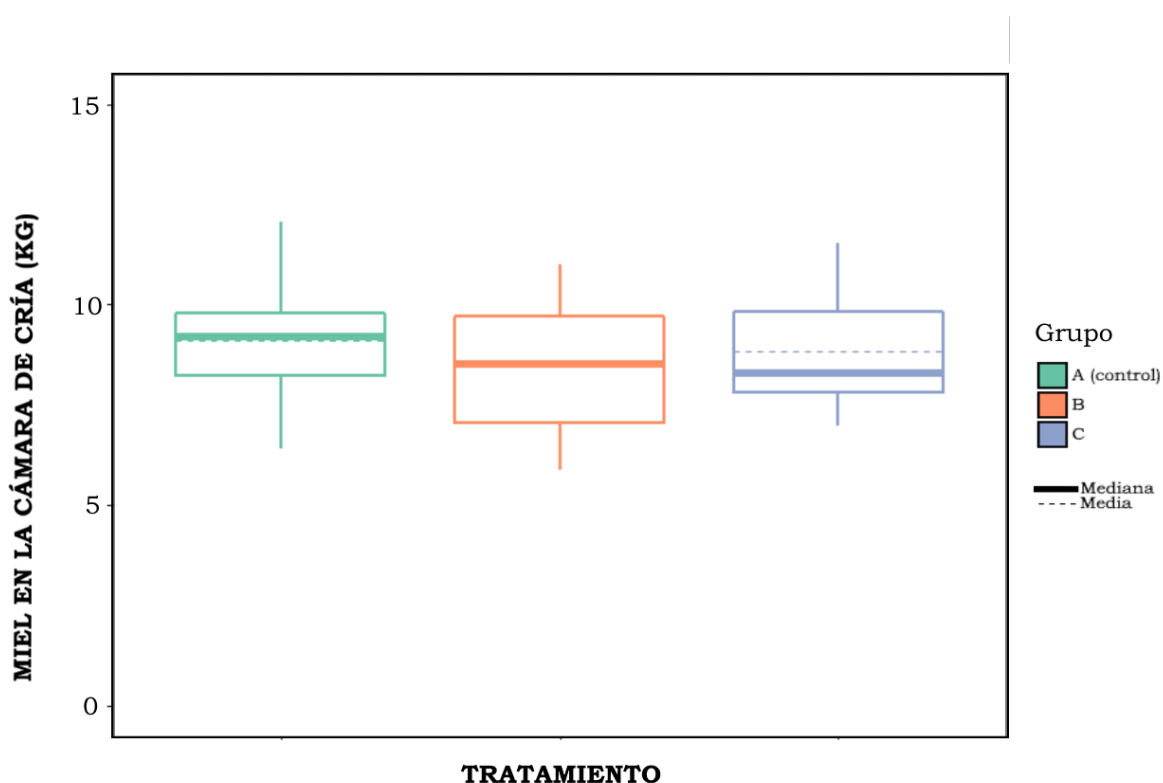
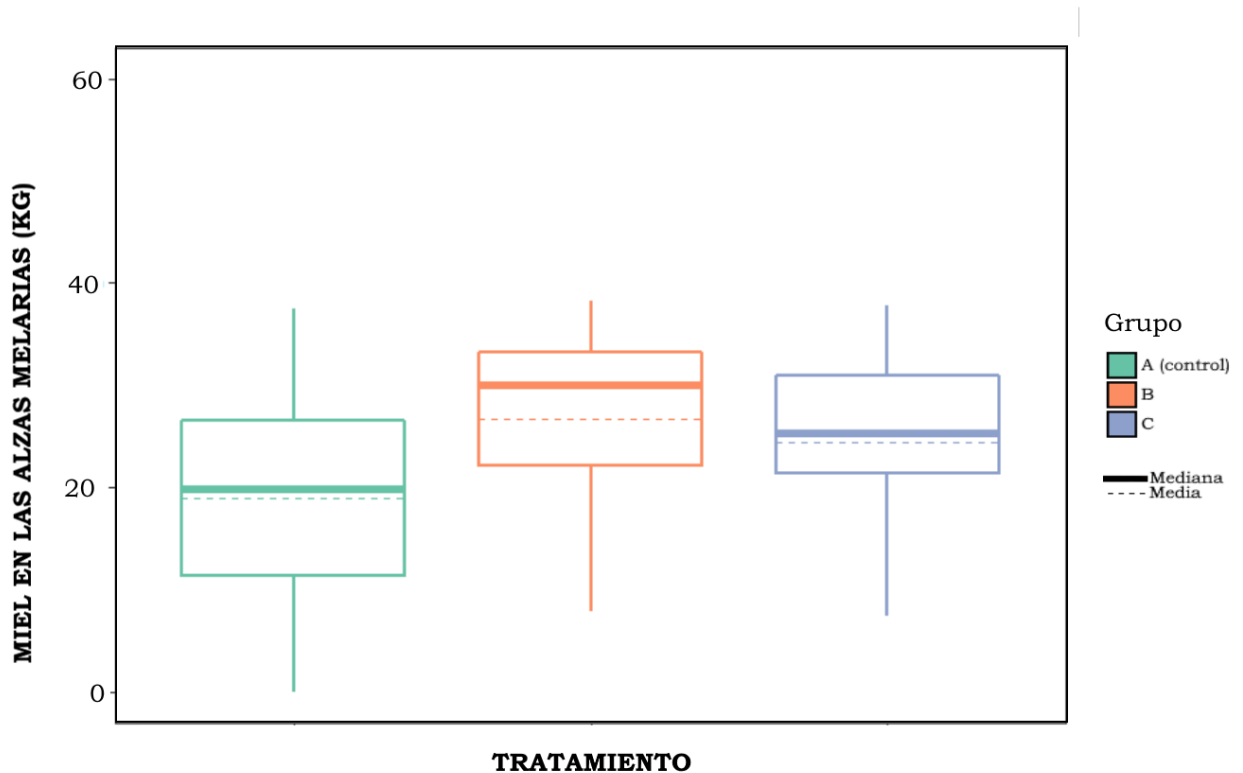


Figura 4. Cantidad de miel almacenada en la cámara de cría en las colmenas de cada uno de los grupos experimentales. Grupo A = colmenas que no recibieron tortas de polen (control), Grupo B = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado a la forestación, Grupo C = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período

de permanencia en la plantación. Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos,



los percentiles 25 y 75, la media y la mediana.

Figura 5. Cantidad de miel almacenada en las alzas melarias en las colmenas de cada uno de los grupos experimentales. Grupo A = colmenas que no recibieron tortas de polen (control), Grupo B = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado a la forestación, Grupo C = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación. Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana.

A partir de los resultados mencionados anteriormente se estimó el peso total de miel almacenada por colmena. El promedio de miel almacenada en las colmenas del grupo control (A) fue de  $28 \pm 10$  kg, en el grupo suplementado hasta el día previo al traslado (B) fue de  $35 \pm 8,4$  kg y en el grupo suplementado a lo largo de todo el ensayo (C) fue de  $33,5 \pm 8,6$  kg. Si bien las colmenas de los dos últimos grupos produjeron más miel

que las colmenas del grupo control, dicha diferencia fue marginalmente significativa (ANOVA,  $p_{\text{Miel total}} = 0,087$ ) (Figura 6).

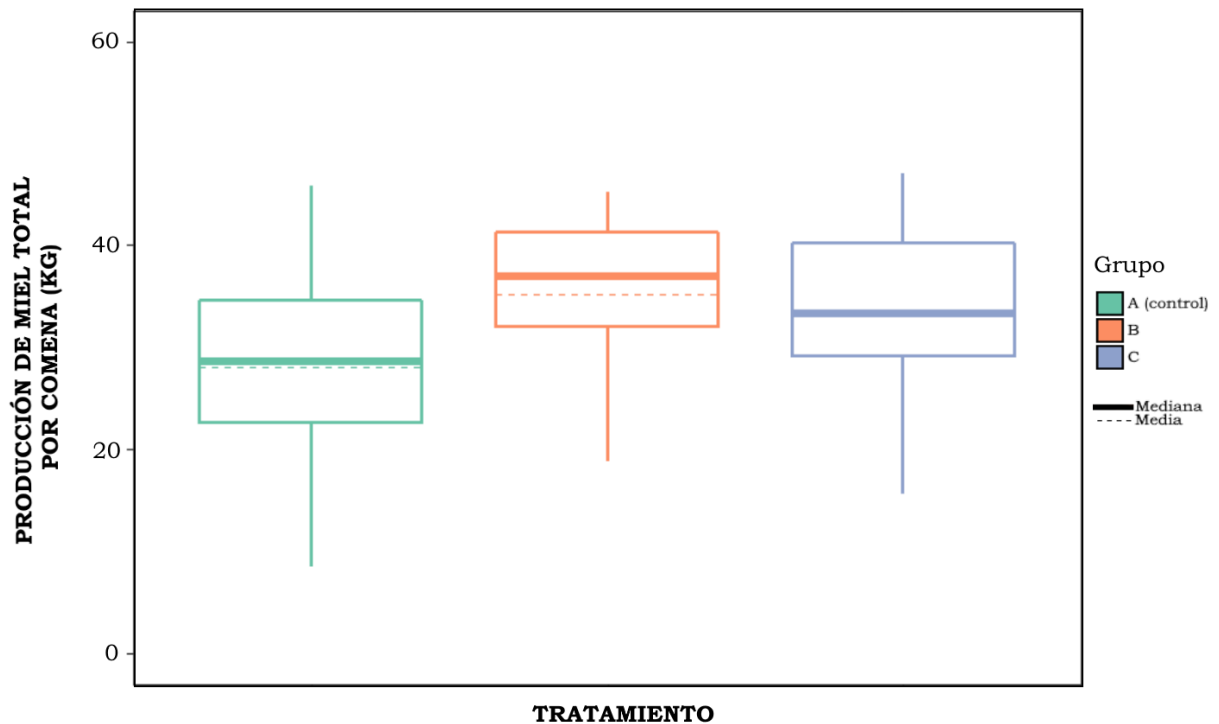


Fig. 6. Cantidad de miel total almacenada en las colmenas de cada uno de los grupos experimentales. Grupo A = colmenas que no recibieron tortas de polen (control), Grupo B = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado a la forestación, Grupo C = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación. Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana.

### 3.3. NIVEL DE INFECCIÓN CON *NOSEMA CERANAE*

De acuerdo al análisis mediante microscopía óptica, al inicio del ensayo y al mes de aplicados los diferentes tratamientos, las colmenas presentaron muy bajo nivel de

infección con *N. ceranae*, siendo este similar entre los diferentes grupos de colmenas (ANOVA,  $p = 0,481$ ). Luego de la estadía en la forestación (tercer muestreo), prácticamente todas las colmenas se encontraron infectadas con este microsporidio. Sin embargo, los niveles de infección resultaron bajos, siendo el valor promedio de 23.000 esporas/abeja para el grupo A, 15.000 esporas/abeja para el grupo B y 12.000 esporas/abeja para el grupo C. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (ANOVA,  $p = 0,229$ ) (Figura 7).

Los análisis del nivel de infección con *N. ceranae* mediante qPCR fueron similares a los obtenidos mediante microscopía óptica. La presencia de este microsporidio se constató únicamente en 4 abejas de las colmenas analizadas del grupo A y 3 abejas de una colmena del grupo C, sin diferencias estadísticamente significativas en el nivel de infección entre las colmenas de ambos grupos (t. test,  $p = 0,377$ ).



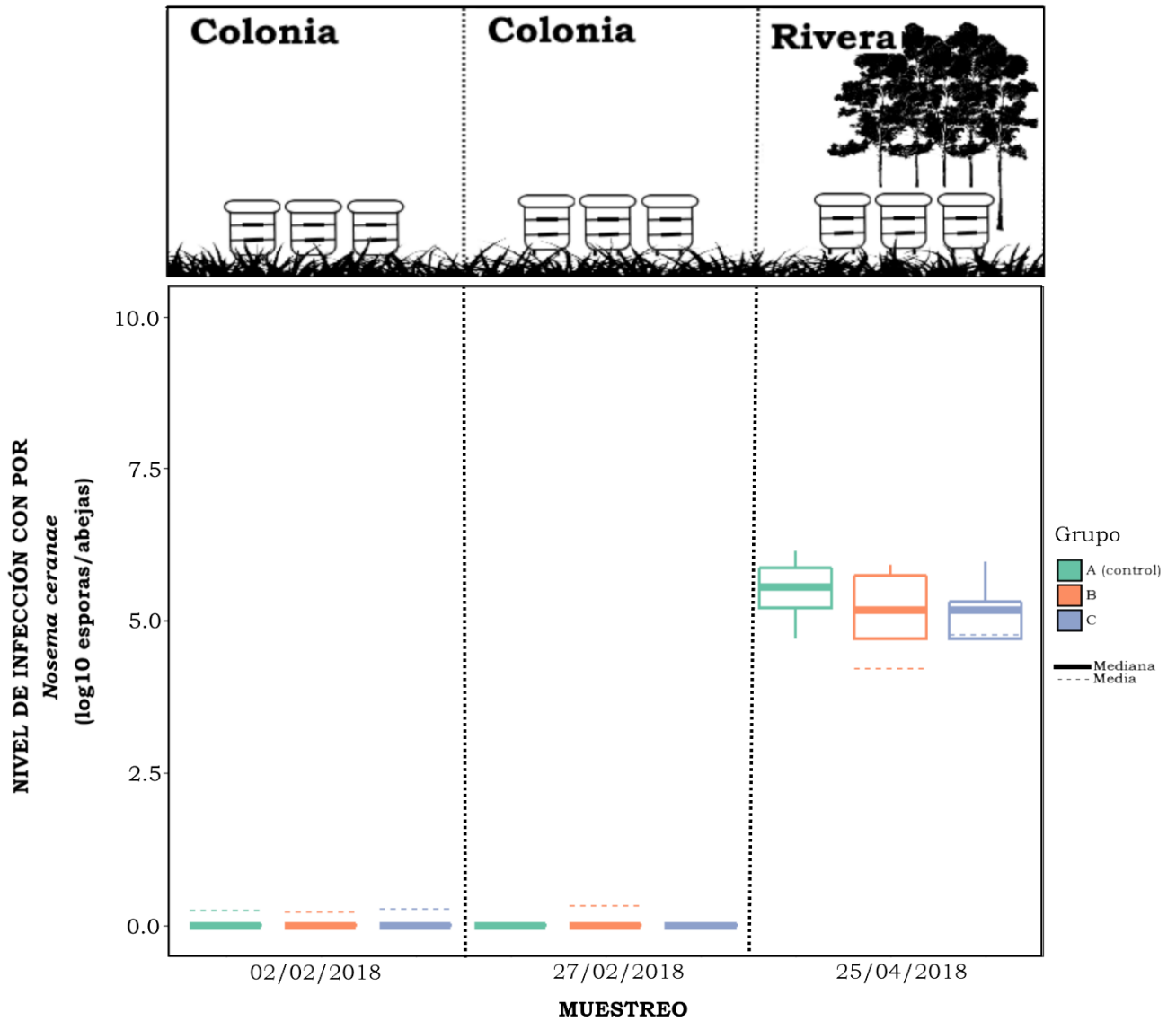


Figura 7. Número de esporas de *N. ceranae*. por abeja para los muestreos 1, 2 y 3. Grupo A = colmenas que no recibieron tortas de polen (control), Grupo B = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado a la forestación, Grupo C = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación. Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana.

### 3.4. ORIGEN BOTÁNICO DEL POLEN COLECTADO POR LAS ABEJAS Y ANÁLISIS DE LAS TORTAS DE POLEN POLIFLORAL

En cuanto al origen botánico del polen colectado, se encontró que para el muestreo 1 el mayor porcentaje en los tres grupos experimentales corresponde al género *Lotus*, las especies *Cynara cardunculus*, *Vicia* sp. y *Sorghum*, seguido por las especies *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y *Glycine max*. En muy bajo porcentaje se encontraron *Sorghum bicolor* y *Baccharis* sp. En el muestreo 2 el mayor porcentaje de polen corresponde a las especies *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y *Glycine max*, seguido por *Trifolium pratense*, *Baccharis* sp. y *Sorghum bicolor*, y en menor porcentaje se encontraron las especies *Lotus* sp., *Solidago chilensis*, *Cichorium intybus*, *Butia* sp., *Vicia* sp. *Taraxacum officinale*, *Senecio* sp. y *Eucalipto* sp. En el último muestreo (muestreo 3) el 98% del polen encontrado en todas las muestras pertenecientes a los tres grupos experimentales procedía de *E. grandis* y el restante 2% a otras especies (*Baccharis* sp, *Senecio* sp, *Solidago chilensis*, *Sorghum bicolor* y *Trifolium pratense*).

La diversidad de polen al inicio del ensayo fue similar entre los tres grupos de colmenas (Kruskal Wallis,  $p_{\text{Muestreo1}} = 0,554$ ). Las colmenas del grupo C presentaron mayor diversidad de polen en el muestreo 2 en comparación de las colmenas de los grupos A y B (Scheffé, Muestreo 2  $p_{A-B} = 0,853$ ,  $p_{A-C} = 0,012$ ,  $p_{B-C} = 0,002$ ). Por otra parte, si bien se observa una tendencia a que las colmenas del grupo control (Grupo A) presentaran mayor diversidad de polen que las colmenas de los grupos B y C, estas diferencias no son significativas (Kruskal Wallis,  $p_{\text{Muestreo3}} = 0,177$ ) (Figura 8).

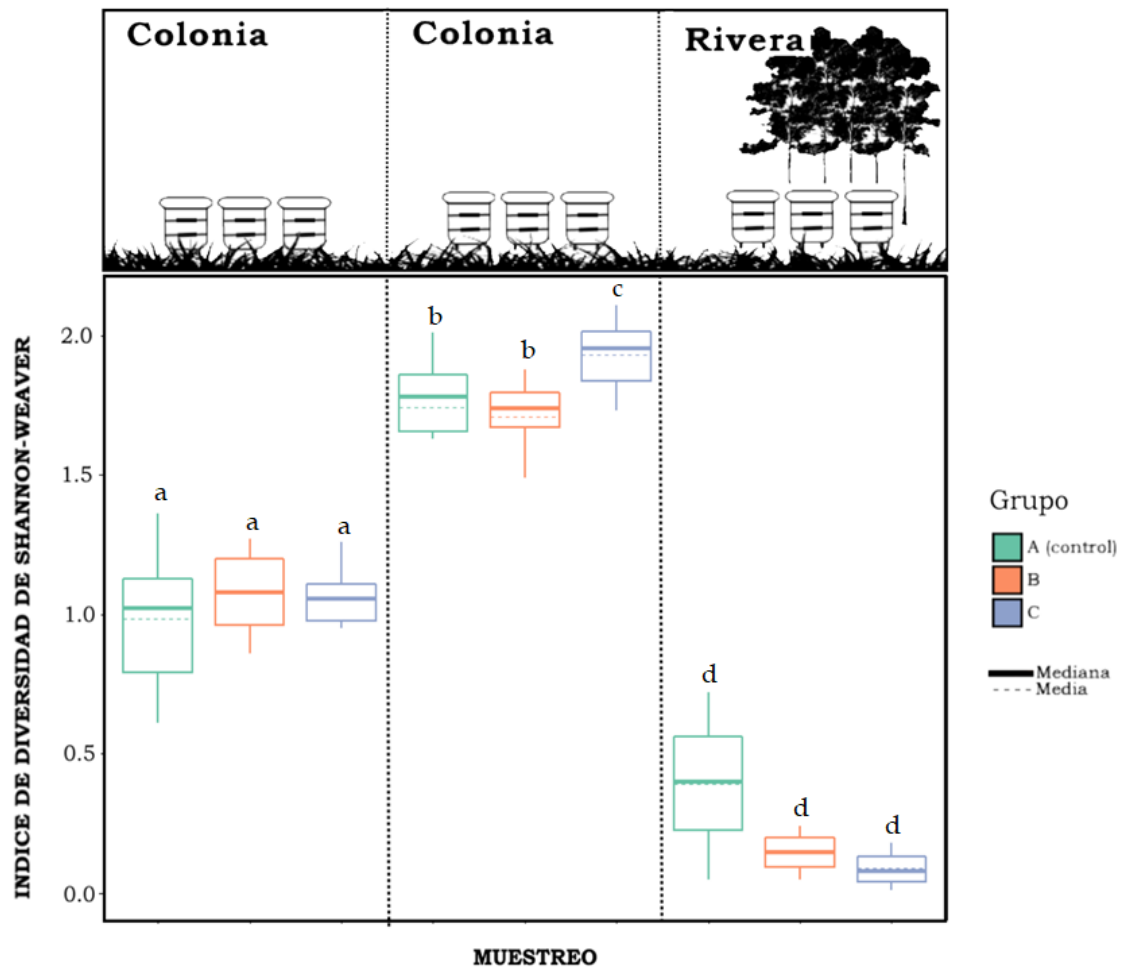


Figura 8. Índice de diversidad Shannon-Weaver para los muestreos 1, 2 y 3. Grupo A = colmenas que no recibieron tortas de polen (control), Grupo B = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado a la forestación, Grupo C = colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación. Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana. Las letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) según el test de ANOVA (Scheffé *a posteriori*) y test Kruskal Wallis.

La torta de polen polifloral utilizada en el ensayo estuvo compuesta por 16 especies de polen (Tabla 1). Su porcentaje de proteína cruda fue de 26,29 % y su contenido de aminoácidos se presenta en la Tabla 2. Se puede observar que la proporción de

aminoácidos esenciales satisface los requerimientos nutricionales de estos compuestos para las abejas según De Groot (1953).

Tabla1. Especies de pólenes encontradas en las tortas de polen polifloral.

<b>Familia</b>	<b>Especie</b>	<b>%</b>
<i>Fabaceae</i>	<i>Lotus spp.</i>	29,3
<i>Myrtaceae</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	11,5
<i>Fabaceae</i>	-	8,9
<i>Fabaceae</i>	<i>Trifolium pratense</i>	7,9
No identificado		6,8
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Scutia buxifolia</i>	6,8
<i>Fabaceae</i>	<i>Medicago sativa</i>	5,2
<i>Fabaceae</i>	<i>Vicia sp</i>	5,2
<i>Myrtaceae</i>	-	4,7
<i>Apiaceae</i>	<i>Ammi viznaga</i>	3,7
<i>Boraginaceae</i>	<i>Echium plantagineum</i>	3,7
<i>Salicaceae</i>	<i>Salix spp.</i>	3,1
<i>Anacardiaceae</i>	-	1,6
<i>Asteraceae</i>	<i>Cirsium vulgare</i>	0,5
<i>Cyperaceae</i>	-	0,5
<i>Iridaceae</i>	<i>Herbetia lahue</i>	0,5

Tabla 2. Proporción de aminoácidos en las tortas de polen polifloral y porcentaje de aminoácidos esenciales establecido por De Groot 1953. Destacados en color gris se encuentran los aminoácidos esenciales para las abejas.

<b>Aminoácido</b>	<b>Proporción de aminoácidos esenciales necesaria (de Groot)</b>	<b>Proporción de aminoácidos encontrada</b>
<i>Ácido Aspartico</i>		10,5
<i>Ácido Glutamico</i>		11,0
<i>Serina</i>		5,5
<i>Glicina</i>		4,8
<i>Histidina</i>	1,5	2,6
<i>Taurina</i>		
<i>Arginina</i>	3	6,5
<i>Treonina</i>	3	4,3
<i>Alanina</i>		5,6
<i>Prolina</i>		12,9
<i>Tirosina</i>		3,7
<i>Valina</i>	4	5,0
<i>Metionina</i>	1,5	1,8
<i>Cisteina</i>		1,2
<i>Isoleucina</i>	4	4,3
<i>Leucina</i>	4,5	7,5
<i>Fenilalanina</i>	2,5	4,7
<i>Lisina</i>	3	6,5
<i>Triptofano</i>	1	1,5

#### 4. DISCUSIÓN

El objetivo del presente ensayo fue evaluar el efecto de la suplementación con polen polifloral y el momento en que esta es suministrada, en la fortaleza, producción de miel y en la infección con *N. ceranae* en colmenas emplazadas en una forestación de *E. grandis*.

Los resultados demuestran que ambas estrategias de suplementación tienen efectos positivos en la población de abejas, coincidiendo con resultados reportados previamente (Branchiccela et al., 2019). Además, la suplementación administrada únicamente previo al traslado de las colmenas a la forestación logró efectos similares a la administrada antes y durante el período de floración de *E. grandis*. Esto constituye una ventaja desde el punto de vista del manejo del apicultor, ya que se observa un efecto similar entre ambos grupos de colmenas suplementadas, requiriendo una menor cantidad de polen y menos visitas al apiario, disminuyendo los costos de este manejo. Además, otro punto a resaltar es que la población de las colmenas suplementadas se mantuvo estable durante el período de permanencia en la forestación, previniendo la clásica despoblación observada en estos ambientes al final de la floración (Invernizzi et al., 2011; Mendoza et al., 2013). Hacia la primavera, la población adulta presentó una notoria disminución en las colmenas de los tres grupos, dinámica poblacional normal en esta época del año, y, si bien no se observan diferencias significativas entre estos grupos, las colmenas suplementadas tendieron a tener mayor número de abejas. Estos resultados muestran que la suplementación con polen polifloral estaría generando un efecto beneficioso a mediano plazo sobre la población de las colmenas, reflejándose en una menor despoblación en colmenas suplementadas, hecho constatado también por Branchiccela (2019).

Por otro lado, no se observó un efecto de la suplementación en la cantidad de cría. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Invernizzi et al. (2011) y difieren con lo reportado por Branchiccela et al. (2019). Estas diferencias pueden deberse a que la composición del polen administrado en los distintos ensayos fue diferente, a la cantidad de polen administrada o a la magnitud de estrés nutricional a la que se enfrentaban las colmenas.

Por otra parte, se observa en los tres grupos experimentales una disminución de la cría hacia el final del período de floración. Esta disminución coincide con la disminución natural esperada en otoño al bajar la temperatura y disminuir la oferta floral.

Los resultados hasta aquí discutidos muestran un aumento de la población de abejas, pero no de la cría en las colmenas suplementadas con polen polifloral, lo cual sugiere que el efecto de esta suplementación se da principalmente aumentando la expectativa de vida de las abejas.

En una colmena el tamaño, la demografía y las necesidades de esta influyen directamente sobre la edad de inicio al pecoreo (Prado et al., 2020). Las abejas con una menor cantidad de días de experiencia aprendiendo a pecorear presentan una vida más corta (Chang et al., 2015), ya que el pecoreo es una actividad que expone a las abejas a las inclemencias del tiempo, la depredación y la deshidratación (Amdam y Omholt, 2002). De esta manera, los resultados previamente mencionados podrían estar indicando que las colmenas del grupo control, al no disponer de polen diverso, comenzaron su actividad de pecoreo más tempranamente, ocasionando de esta manera una muerte más temprana de las abejas.

En cuanto a la producción de miel, no se observó un efecto significativo de la suplementación de polen, coincidiendo con antecedentes previos (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019). La mayor población adulta de las colmenas suplementadas no se tradujo en una mayor producción de miel, aunque hay una tendencia en ese sentido. Es posible que la suplementación con polen polifloral haya alargado la etapa de nodriza y de esta manera haya maximizado la capacidad de trabajo de la abeja pecoreadora. Sin embargo, estos efectos a nivel poblacional no fueron suficientes como para observar cambios significativos a nivel productivo. Esto podría deberse a que la suplementación administrada no fue suficiente como para observar diferencias en este parámetro. Por otro lado, es importante considerar que la cantidad de miel producida por las colmenas en este estudio fue inferior al promedio habitual (50 kg por colmena) (Branchiccela et al., 2020), por lo que este factor puede estar asociado a la ausencia de diferencias en el acopio de miel entre las colmenas de los tres grupos. Por último, el hecho de que no se observaran diferencias en la producción

miel de las colmenas suplementadas antes del traslado, y antes y durante, sugiere que ambas estrategias son relativamente equivalentes y, por lo tanto a nivel productivo es más práctico administrar el polen polifloral únicamente antes de la zafra. Teniendo en cuenta que las colmenas suplementadas produjeron entre 5 y 7 kg de miel más que las colmenas del grupo control, se estimó el costo y el beneficio de suplementar las colmenas antes del traslado a una forestación partiendo de precios para los insumos y venta de miel de final del segundo semestre de 2021. En la tabla 1 del Anexo 1 se detallan los supuestos utilizados para los cálculos. Los cálculos arrojaron que el costo de una torta de polen sería de U\$S 1 y los beneficios por aumento de producción de miel (estimados en 6 kg, promedio de producción extra de los dos grupos de colmenas suplementadas) sería de U\$S 15. Estos datos muestran que el uso de tortas de polen sería económicamente rentable para los apicultores que llevan las colmenas a las forestaciones de *E. grandis* si se dieran las condiciones en las que se realizó el estudio y se mantuvieran los supuestos con los que se hicieron los cálculos. Sería importante evaluar la respuesta de los sustitutos comerciales del polen como una opción más económica y accesible para el productor.

En el presente estudio, los niveles de infección de las colmenas con *N. ceranae* mientras permanecieron en la forestación resultaron sumamente bajos, a diferencia de lo observado en estudios previos (Invernizzi et al., 2011, Mendoza et al., 2012, Branchiccela et al., 2019). Una posibilidad para explicar este resultado inesperado es que en el año en que se llevó a cabo el estudio no se dieran las condiciones para que el microsporidio proliferara. La disponibilidad de polen diverso contribuye a mantener menores niveles de infección por *N. ceranae* (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019; Castelli et al., 2020). Debido a que el muestreo de polen para determinar su origen botánico se realizó hacia el final de la floración (donde netamente predominaba el polen de *E. grandis*), un posible ingreso de polen diverso los días siguientes a la llegada de las colmenas no fue detectado. A su vez, no se puede descartar la existencia de factores relacionados a la particularidad del año en que se hizo el trabajo (efecto año) que hayan limitado la multiplicación de *N. ceranae*.

Otra posibilidad es que los niveles de *N. ceranae* se puedan haber visto afectados también por la utilización de ácido oxálico previo al traslado, producto empleado para



el control de *V. destructor*. Nanetti et al. (2015) reportaron que la utilización del ácido oxálico en jarabe de sacarosa en condiciones de laboratorio y de campo disminuye los niveles de infección con *Nosema* spp. a nivel individual y colonial. Si bien no se ha demostrado que el control de *V. destructor* con ácido oxálico administrado de tiras de cartón tenga efectos sobre los niveles de infestación con *Nosema ceranae*., es una hipótesis plausible que amerita ser abordada en el futuro.

La única diferencia metodológica observada entre esos estudios y este es el de las abejas analizadas. Invernizzi et al. (2011), Mendoza et al. (2012) y Branchiccela et al. (2019) colectaron abejas pecoreadoras en la entrada a la colmena y en el presente estudio se colectaron abejas del interior de la colmena en cuadros lejanos al área de cría. Ambas metodologías son aceptadas para el diagnóstico y detección de la nosemosis (Fries et al, 2013). Podría haber ocurrido que buena parte de las abejas colectadas en este estudio no fueran mayores a 10 días y que por ende, no presentaron aún niveles de infección visibles (debido al ciclo de *N. ceranae*, la infección aumenta con la edad de las abejas). Sin embargo, el resultado del análisis de qPCR en abejas de 10 días de edad, corrobora que, en efecto, las abejas presentaban bajos niveles de infección, haciendo poco plausible la asociación entre los niveles de infección y la metodología utilizada.

Teniendo en cuenta estas observaciones, sería interesante repetir este ensayo de forma de abarcar distintos escenarios y arribar a conclusiones más generalizables.

Respecto a la diversidad botánica del polen colectado por las abejas, se observan diferencias significativas entre los grupos únicamente en el momento previo al traslado de las colmenas a la forestación (muestreo 2), siendo el grupo suplementado a lo largo del experimento (grupo C) el que presentó la mayor diversidad. Este resultado llama la atención, ya que en ese punto del ensayo los dos grupos de colmenas asignados para suplementar con polen aún no se habían diferenciado, por lo que era esperable que se encontrasen en las mismas condiciones. No obstante, los valores del índice de Shannon Weaver muestran que la diferencia no fue tan notoria. El promedio del índice de Shannon Weaver para cada grupo experimental en el muestreo 2 fue de:  $H_{\text{GrupoA}}=1,74$ ,  $H_{\text{GrupoB}}=1,71$  y  $H_{\text{GrupoC}}=1,93$ .

En los otros muestreos la suplementación con polen polifloral no incidió en los recursos botánicos explotados por las abejas. Si bien en el muestreo realizado al final de la floración se observa una tendencia a tener mayor diversidad de pólenes en las colmenas no suplementadas, estas diferencias no son estadísticamente significativas. En este sentido, Branchiccela et al. (2019) reportaron que las colmenas no suplementadas presentaban mayor diversidad de polen que las colmenas suplementadas, aunque con un respaldo estadístico marginal. Los autores interpretaron este llamativo resultado señalando que las abejas de las colmenas sin suplementar tenderían a presentar una mayor actividad de pecoreo teniendo como consecuencia un mayor ingreso de polen diverso (Branchiccela et al., 2019). Las diferencias encontradas entre el presente estudio y el de Branchiccela et al. (2019) pueden deberse a diferencias a nivel ambiental y/o a las condiciones en que se desarrollaron los ensayos. Esto, sumado a los bajos niveles de infección con *N. ceranae*, podría estar dando la pauta de que las abejas del presente estudio tuvieron un comportamiento diferente por estar enfrentadas a condiciones ambientales más beneficiosas que llevaron a que se sufrieran un menor estrés nutricional.

En cuanto a la composición de las tortas de polen polifloral, estaban formadas por 16 especies, a diferencia de las tortas suministradas en el estudio de Branchiccela (2019), las cuales contenían 23 especies. No obstante, ambas tortas presentaron índices de diversidad de Shannon-Weaver similares ( $H=2,34$  (este estudio),  $H=2,29$  (Branchiccela et al., 2019)). En cuanto a la presencia de pólenes ricos en proteína cruda hay presentes cuatro especies que se destacan por tener polen con más del 25% de proteína cruda, considerados buenos por Kleinschmidt y Kondos (1976). Estos pólenes provienen de lotus, trébol rojo, borraja y alfalfa, representando entre estas cuatro especies el 46% de la composición de la torta. De este modo, las tortas utilizadas eran ricas en especies con buenos niveles de proteína cruda y con una óptima proporción de aminoácidos esenciales. Es importante destacar que las abejas consumieron las tortas de polen y no lo almacenaron en las celdas. Este uso de las tortas de polen quedó evidenciado con el análisis de las muestras de polen tomadas de las celdas, siendo muy claro en el tercer muestreo (hacia el final de la floración) en donde el polen encontrado correspondió en un 98% a *E. grandis*.

En suma, este estudio muestra, además, que la suplementación de las colmenas con tortas de polen polifloral, ricas en proteína cruda y con óptimas proporciones de aminoácidos esenciales, generó un efecto positivo en la supervivencia de las abejas adultas. La suplementación tuvo además un efecto sobre la producción de miel. Si bien este resultado no fue significativo, la tendencia observada muestra que el aporte de polen es una estrategia de manejo potencialmente beneficiosa.

Este estudio muestra además que la suplementación previa al traslado bastaría para obtener resultados beneficiosos sobre la población adulta y potencialmente sobre la producción de miel.

Por otra parte, es importante destacar que el año en que se llevó a cabo este ensayo fue atípico en cuanto a los niveles de Nosemosis, con valores sumamente bajos.

Sería interesante poder repetir este estudio, implementando a su vez nuevas estrategias de suplementación proteica con sustitutos comerciales, de forma de simplificar el manejo apícola con productos accesibles para los productores que trasladan sus colmenas para explotar las forestaciones de *E. grandis*.

## **Capítulo 2- Efecto de la suplementación con polen polifloral en la expresión de genes vinculados al estado nutricional, longevidad e inmunidad de las abejas**

El polen consumido por las abejas varía a lo largo de su vida, acompañado por cambios en la fisiología y anatomía (Moritz y Crailsheim, 1987). Una vez absorbidos, los nutrientes son almacenados en los cuerpos grasos y de allí son transportados a las glándulas hipofaríngeas a través de la fosfoglicolipoproteína Vitelogenina (Fluri et al., 1982; Amdam et al., 2010), una molécula que tiene efectos pleiotrópicos en la maduración comportamental de las abejas, las capacidades sensoriales, la expectativa de vida y la especialización de pecoreo, y que reduce el estrés oxidativo. Consecuentemente, un aumento de nutrientes produce un aumento de vitelogenina en las abejas, por lo que la vida de las abejas se ve afectada por la cantidad y la calidad de los nutrientes consumidos, reflejándose a nivel colonial en su población y producción de miel (Fluri et al., 1982; Moritz y Crailsheim, 1987), Amdam et al., 2010). La nutrición con diferentes pólenes afecta la expectativa de vida de las abejas, su inmunocompetencia, su resistencia a la infección con patógenos y su comportamiento.

Las forestaciones de *E. grandis* explotadas por los apicultores durante la floración de otoño por el gran aporte de néctar y polen constituyen un escenario natural para estudiar el impacto de la nutrición en las abejas (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019). En estos monocultivos las abejas son expuestas a un fuerte estrés nutricional debido a la disponibilidad de una única especie principal de polen pobre nutricionalmente y a que son sometidas a una intensa actividad en un momento en que la colmena debería prepararse para invernarse (Branchiccela et al., 2019). Esto impacta a nivel sanitario, aumentando los niveles de infección con *N. ceranae*. En estas condiciones es notorio el debilitamiento de las colmenas hacia el final de la floración de *E. grandis* (Invernizzi et al., 2011; Mendoza et al., 2012, Mendoza et al., 2014a, Mendoza et al., 2014b, Branchiccela et al., 2019). Uno de los mecanismos propuestos para poder mitigar el debilitamiento de las colmenas y aumentar la producción de miel es la suplementación con polen polifloral (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de las colmenas con tortas de polen polifloral sobre el nivel de expresión de genes vinculados al estado nutricional, la inmunidad humoral, celular y social, apoptosis y la longevidad de las abejas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Este estudio se realizó con las colmenas trasladadas a una forestación de *E. grandis* del estudio del Capítulo 1. Transcurrido un mes de instaladas las colmenas (3 de abril), cuando ya los *E. grandis* estaban plenamente florecidos, se seleccionaron al azar tres colmenas del grupo A (control) y tres colmenas del grupo C (que recibió suplementación con torta de polen polifloral antes y durante la estadía en la forestación). Si bien dicha selección fue al azar, se verificó que la población y desempeño de estas colmenas fuera similar al del resto de las colmenas del grupo experimental. De cada colmena se tomaron cuadros conteniendo cría operculada pronta para emerger. Las abejas emergidas en las siguientes horas (aproximadamente 90 abejas por cada colmena) se marcaron en el tórax con marcador Uniposca, asignando diferentes colores a las abejas de las colmenas de cada grupo. Luego de ser marcadas las abejas se reintrodujeron el mismo día a sus respectivas colmenas y 10 días después se recuperaron un mínimo de 9 abejas de cada colmena. Se mantuvieron con vida hasta llegar al Departamento de Microbiología del IIBCE en donde se sacrificaron a  $-80^{\circ}$  con el fin de preservar el ARNm para los análisis moleculares. El procedimiento realizado en este ensayo se detalla en la Figura 9.

### Forestación de *E. grandis*- Departamento de Rivera

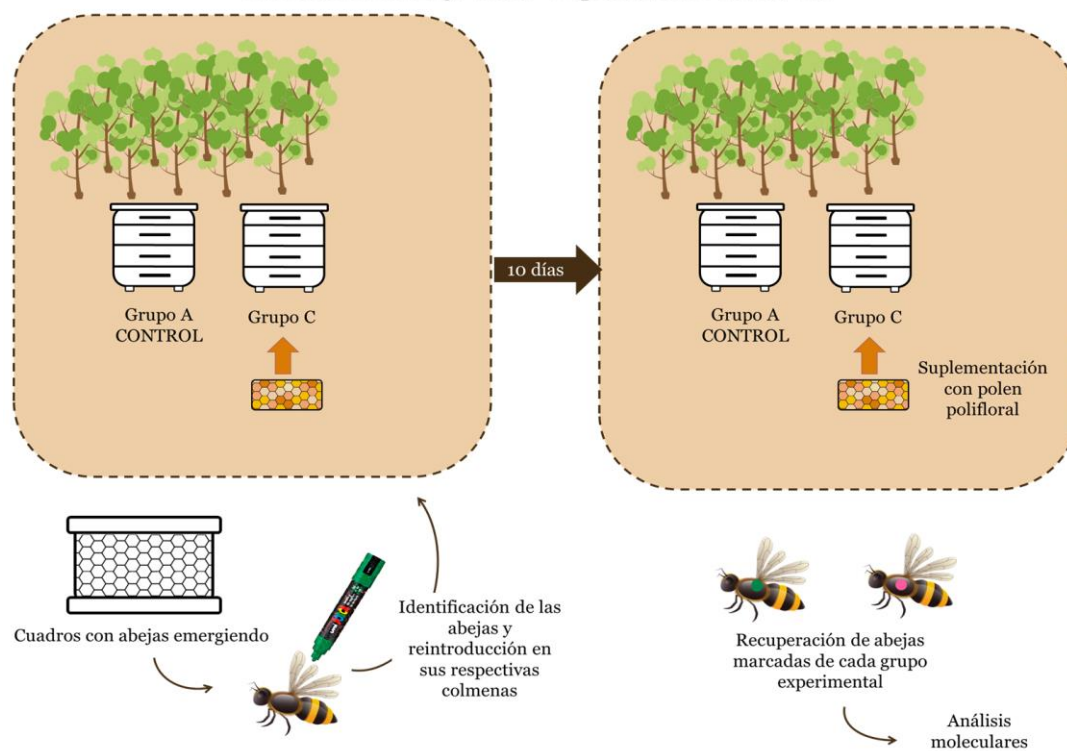


Figura 9. Esquema representativo de los procedimientos realizados sobre los grupos experimentales

Se evaluó el efecto de la suplementación en la respuesta inmune celular y humoral, así como su estado nutricional y la inmunidad social de las abejas.

Para ello se analizó la expresión de los siguientes genes:

- 1) Gen que codifica para la himenoptecina: péptido antimicrobiano (Casteels et al., 1993).
- 2) Gen que codifica para la pro fenoloxidasa: proteína que forma parte de la cascada de la fenoloxidasa, cuya activación lleva a la formación de la melanina (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994). Se utilizó como parámetro de la respuesta inmune celular.

- 3) Gen que codifica para la vitelogenina: fosfoglicolipoproteína, principal transportador de proteínas por la hemolinfa (Johnson et al., 2009). Se utilizó como indicador del estado nutricional de las abejas, de la condición fisiológica y de la longevidad.
- 4) Gen que codifica para la glucosa oxidasa: enzima involucrada en la formación de peróxido de hidrógeno (antiséptico) (Alaux et al., 2010). Se utilizó como un parámetro de inmunidad social.
- 5) Gen que codifica para la deterina: proteína miembro de la familia de los inhibidores de la apoptosis (Ambrosini et al., 1997).

## **5.2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE DE LAS ABEJAS**

Se homogeneizaron de forma individual 9 abejas de cada una de las tres colmenas pertenecientes al grupo A y al grupo C. Cada abeja fue homogenizada individualmente en tubos con perlas de cerámica con el buffer de lisis (Qiagen) por 1 minuto a velocidad 5.5 rpm en un equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA). Posteriormente se extrajo el ARN utilizando el kit comercial RNeasy Plus (Qiagen), siguiendo las instrucciones pautadas por el fabricante. El ADN coextraído se digirió con DNasa I (Invitrogen) y posteriormente el ARN se retrotranscribió a ADNc empleando el High Capacity cDNA Reverse Transcription *Kit* (Applied Biosystems, Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó para analizar la expresión de los genes previamente mencionados (himenoptecina, pro fenoloxidasa, vitelogenina, glucosa oxidasa y deterina), empleando cebadores descritos en la literatura (Apéndice 1, Tabla 2). Las reacciones de PCR consistieron en 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µM de cada cebador (tabla 3) y 2 µl de cDNA en un volumen final de 20 µl. El programa de ciclado consistió en 10 min a 95 °C (preincubación), 40 ciclos de 15 seg a 95 °C (amplificación), 30 seg a temperatura de *annealing* (esta temperatura varía dependiendo de los cebadores utilizados, detalle en tabla 2 del apéndice 1), 30 seg a 60 °C, 65 a 95 °C (melting curve) y 4 °C (enfriado). Las reacciones se realizaron en un termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR System (Biorad).

Para la normalización de los datos se empleó la media geométrica de la expresión de la  $\beta$ -actina y RPS5 (Tabla 2 del apéndice 1), genes de expresión constitutiva de la abeja. Con el fin de obtener las eficiencias de cada reacción, se construyó una curva estándar empleando diluciones seriadas (1/10) de una de las muestras de ADN. El nivel de expresión relativa de los diferentes genes se determinó mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), utilizando como grupo calibrador el grupo control (sin suplementar).

### **5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la suplementación con polen polifloral en la expresión de genes vinculados con el estado nutricional y con la respuesta inmune de la abeja, se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). Se utilizó el *ratio* de expresión de los genes como variable de respuesta, el tratamiento experimental como variable fija y la colmena a la que pertenecían las abejas como variable aleatoria. Para estos análisis se utilizó la distribución gamma y la función de conexión log.

Se consideró un nivel de confianza del 95% y se usó el software R Studio (R Studio Team, 2016)

## **6. RESULTADOS**

Las abejas suplementadas con polen polifloral presentaron una mayor expresión de los genes *vitelogenina* y *glucosa oxidasa* comparados con las abejas del grupo control (GLMM, *vitelogenina*:  $p = 0,012$ , *glucosa oxidasa*:  $p = 0,014$ ) (Figura 8; tabla 3).



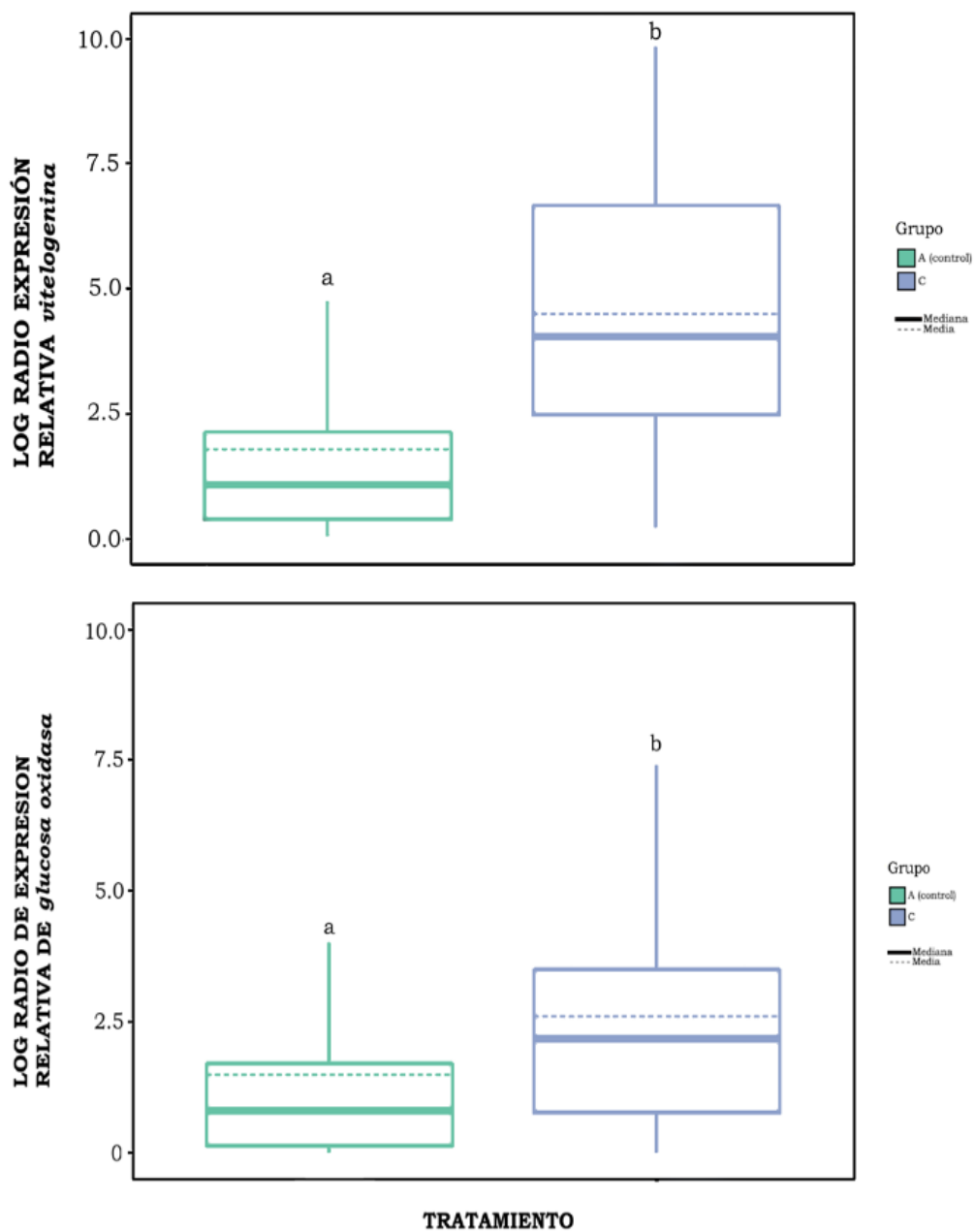


Figura 8. Radio de expresión de los genes que codifican para *vitelogenina* (arriba) y *glucosa oxidasa* (abajo), en el grupo A (control, colmenas que no recibieron tortas de polen) y en el grupo C (colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación). Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana.

Las letras diferentes indicadas muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). Análisis realizados con modelos lineales generalizados mixtos (GLMM).

Tabla 3–Resultados estadísticos del GLMM al comparar la expresión de diferentes genes de abejas provenientes de colmenas suplementadas y no suplementadas con

Variable respuesta	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	P valor
<i>Vitelogenina</i>	0,163	-0,175	0,012 *
<i>Himenoptecina</i>	-0,232	-0,031	0,372
<i>Fenol oxidasa</i>	-0,223	0,014	0,750
<i>Glucosa oxidasa</i>	-0,086	0,380	0,014 *
<i>Deterina</i>	-0,229	-0,055	0,004 **

tortas de polen polifloral durante su permanencia en forestaciones de *E. grandis*

Por otro lado, la expresión de los genes *himenoptecina* y *pro fenoloxidasa* fue similar en ambos grupos (GLMM *himenoptecina*:  $p = 0,372$ , *pro fenoloxidasa*:  $p = 0,75$ ) (Figura 9; tabla 3). Finalmente, las abejas suplementadas con polen polifloral presentaron una menor expresión del gen asociado con la apoptosis celular, *birc5*, en comparación a las abejas del grupo control (GLMM, *deterina*:  $p = 0,004$ ) (Figura 10; tabla 3).

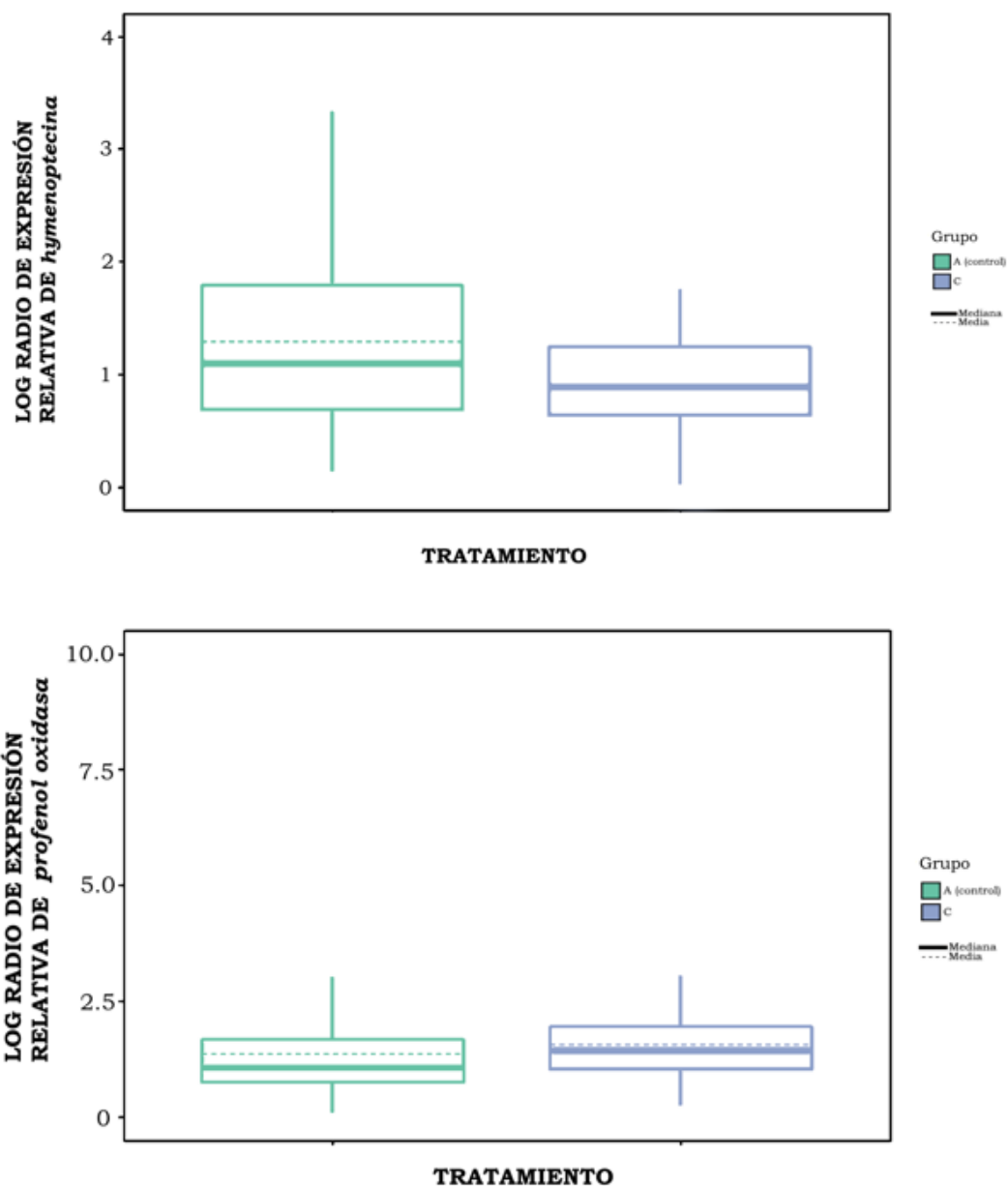


Figura 9. Radio de expresión de los genes que codifican para *himenoptecina* (arriba), *pro Fenoloxidasa* (abajo) en el grupo A (control, colmenas que no recibieron tortas de polen) y en el grupo C (colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación). Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana.

Las letras diferentes indicadas muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). Análisis realizados con modelos lineales generalizados mixtos (GLMM).

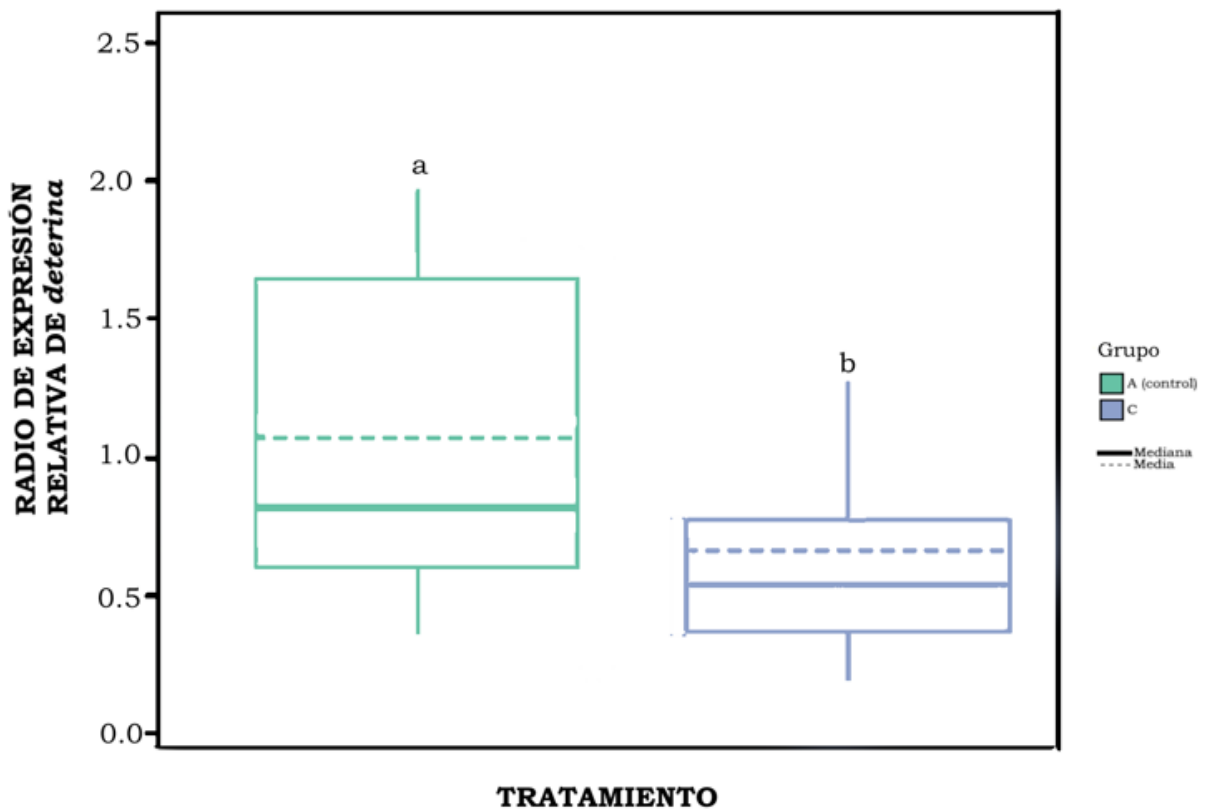


Figura10. Radio de expresión de los genes que codifican para *Deterina* en el grupo A (control, colmenas que no recibieron tortas de polen) y en el grupo C (colmenas que recibieron tortas de polen cada 15 días, durante el mes previo al traslado y durante todo el período de permanencia en la plantación). Los *boxplot* indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75, la media y la mediana.

Las letras diferentes indicadas muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). Análisis realizados con modelos lineales generalizados mixtos (GLMM).

## 7. DISCUSIÓN

En años recientes, diversos estudios han mostrado en condiciones controladas de laboratorio que el tipo de dieta proteica (en términos de diversidad de polen) afecta la respuesta inmune humoral, celular y social de las abejas (Alaux et al., 2010; Di Pasquale et al., 2013). Esta asociación es difícil de estudiar en condiciones de campo debido a la multiplicidad de factores que afectan las colonias de abejas. Sin embargo, las forestaciones de *E. grandis* son un ambiente propicio para analizar en condiciones de campo el impacto del estrés nutricional en la expresión de genes de inmunidad de las abejas, dejando de lado otras variables que podrían afectar esta expresión génica como por ejemplo, la exposición a pesticidas (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019; Branchiccela et al., 2020).

Este segundo ensayo tuvo como objetivo evaluar a nivel de campo el efecto de la suplementación con polen polifloral sobre la respuesta inmune celular humoral y social, así como en su estado nutricional, longevidad, y estrés oxidativo de las abejas. En primer lugar, se encontró que los niveles de expresión de la *vitelogenina* fueron significativamente mayores en las abejas del grupo suplementado en comparación con los de las abejas del grupo control. Este resultado muestra que las abejas de las colmenas suplementadas presentaban un mejor estado nutricional que las abejas que disponían principalmente de polen de *E. grandis*. Resultados similares fueron encontrados por Castelli et al. (2020) en un estudio de laboratorio con abejas confinadas. A su vez, teniendo en cuenta que se ha reportado que los mayores niveles de esta proteína están asociados a un aumento en la longevidad de las abejas (Amdam et al., 2012), los mayores niveles de *vitelogenina* encontrados en las colonias suplementadas podría explicar el resultado encontrado en el estudio del Capítulo 1, en el que colonias suplementadas presentaron mayor población que las no suplementadas, pero no afectó el área de cría.

En cuanto a la *glucosa oxidasa*, se pudo observar un mayor nivel expresión de este gen en el grupo de colmenas suplementadas en comparación al control, coincidiendo con lo reportado por Alaux et al. (2010) y Castelli et al. (2020) en condiciones de laboratorio. Estos autores propusieron que la estrecha relación entre la expresión de

este gen y la dieta proteica a la que se somete a las abejas podría estar indicando que las abejas invierten más recursos en la inmunidad social que en la individual. Estos resultados concuerdan con el hecho de que las abejas melíferas poseen únicamente un tercio de los genes de respuesta inmune descritos para insectos solitarios (Weinstock et al., 2006), lo que resalta la importancia de los mecanismos sociales de respuesta a los parásitos y patógenos en la supervivencia de la colonia (Evans et al., 2006, Cremer et al. (2007).

La expresión de la deterina, proteína codificada por el gen *birc5* que inhibe la apoptosis (Zamora et al., 2005), fue significativamente menor en las abejas pertenecientes a las colmenas suplementadas. Este mecanismo es manipulado por *N. ceranae* para evitar la muerte celular prematura y, consecuentemente, maximizar su reproducción (Martín Hernández et al., 2018). Teniendo en cuenta las diferencias marginales en la infección con *N. ceranae* de colmenas control y suplementadas, es más probable que las diferencias en los niveles observados de *birc5* obedezcan principalmente a las diferencias en la disponibilidad de polen y no tanto a un posible efecto del parásito. En este contexto, posiblemente el mejor estado nutricional de las abejas facilita la disponibilidad de recursos celulares para desplegar una respuesta de defensa compleja para retener la infección con el microsporidio, y en estas condiciones la manipulación del sistema inmune por *N. ceranae* se vea minimizada.

Por otro lado, se ha reportado que la respuesta inmune mediada por la himenoptecina es un mecanismo general frente a la infección con patógenos (Doublet et al., 2017) y en particular para *N. ceranae* (Branchiccela et al., 2020). Además, se ha reportado que colmenas suplementadas con polen polifloral presentan menores niveles de infección con *N. ceranae* (Branchiccela et al., 2019). En las condiciones de este ensayo, no pudimos comprobar estas relaciones, posiblemente debido a los bajos niveles de infección con *N. ceranae* encontrados. Al margen de que los niveles de infección fueron muy bajos, las colmenas suplementadas tendieron a estar menos infectadas y a presentar mayores niveles de expresión de *himenoptecina* que las colmenas del grupo control. Estos resultados, junto a los antecedentes planteados, permiten sugerir que un mejor estado nutricional de las abejas permitiría desplegar una mayor respuesta inmune mediada por la himenoptecina para defenderse de *N. ceranae*. Esta hipótesis

debería verificarse en un escenario natural con mayores niveles de infección con dicho microsporidio.

No se encontraron diferencias en la expresión de la proteína humoral profenol oxidasa entre abejas alimentadas con distintos tipos de polen coincidiendo con lo encontrado por Alaux et al. (2010) y di Pasquale et al. (2013) en condiciones de laboratorio.

En suma, este estudio mostró, en condiciones de campo, que el suministro de tortas de polen polifloral desencadena respuestas a nivel inmunitario humoral y social. La suplementación con polen polifloral generó una mayor expresión del gen *vitelogenina*, brindando a las abejas que recibieron suplementación un mejor estado nutricional y mayor longevidad. A su vez, los mayores niveles de glucosa oxidasa encontrados en el grupo suplementado dan la pauta de que las abejas invierten más recursos en la inmunidad social que en la individual.

## 8. APORTES DE LA TESIS

La apicultura en forestaciones de *E. grandis* es una práctica que se ha consolidado en Uruguay, especialmente entre apicultores profesionales que cuentan con un número importante de colmenas y los medios para transportarlas al final del verano (Branchiccela et al., 2020). No obstante, la experiencia acumulada, los problemas de despoblamiento de las colmenas continúan reportándose. La investigación nacional generada a lo largo de 15 años muestra que en las forestaciones de *E. grandis* se dan condiciones particulares que debilitan a las colmenas y que, eventualmente, pueden ocasionar pérdidas importantes: falta de flora acompañante durante buena parte del período de floración, polen de bajo valor nutritivo, importantes niveles de infección por *N. ceranae* (Invernizzi et al., 2011; Mendoza et al., 2012, Mendoza et al., 2014a, Mendoza et al., 2014b, Branchiccela et al., 2019). En particular, el estudio realizado por Branchiccela et al. (2019) mostró que el uso de tortas de polen polifloral tenía efectos positivos en la fortaleza de las colmenas y en el nivel de infección por *N. ceranae*, aunque estas diferencias no se tradujeron en un aumento de la producción de miel de las colmenas suplementadas. Los autores atribuyeron este último resultado a que la diferencia en la fortaleza de las colmenas se consolidó cuando la floración de *E. grandis* llegaba a su fin. Así, el estudio de Branchiccela et al. (2019) dejaba planteada la posibilidad de emplear la suplementación con polen polifloral previo al traslado de las colmenas a las forestaciones como una pauta de manejo para reducir el impacto de *N. ceranae* y aumentar la producción de miel.

Con este antecedente inmediato, se llevó adelante el primer estudio de esta tesis (Capítulo 1), donde se buscó ver el efecto a nivel poblacional, sanitario (nosemosis) y productivo de las colmenas con dos regímenes de suplementación con polen polifloral, antes del traslado de las colmenas (un mes) y antes del traslado y durante la floración de *E. grandis*.

Un primer resultado relevante fue que la suplementación con tortas de polen polifloral previo al traslado a la forestación permitió llevar colmenas con mayor población que las no suplementadas y las diferencias en población se mantuvieron hacia el final de la floración de *E. grandis*. Teniendo en cuenta que los productores buscan llevar a la forestación colmenas bien pobladas para aprovechar el intenso flujo de néctar de los



eucaliptos durante 50 días aproximadamente, y luego retirar las colmenas con la población suficiente como para asegurar una buena invernada, estos resultados señalan que el aporte de un suplemento de polen de calidad puede ser una contribución importante. Otro resultado favorable en este sentido que aportó el estudio es que la continuidad de la suplementación durante el período de floración de *E. grandis* no significó un beneficio extra para la población de las colmenas, por lo que bastaría con una suplementación durante el mes previo al traslado. Esta suplementación previa con tortas de polen se realizó solo dos veces cada 15 días, en una operación sencilla que no insume mucho tiempo en el apiario. De este modo, un apicultor que prepare colmenas para llevar a las forestaciones puede realizar esta suplementación en las visitas previas a las colmenas sin necesidad de agregar un tiempo extra de manejo. Por último, el aporte de polen polifloral podría tener un beneficio a mediano plazo durante la invernada, ya que, si bien las colmenas suplementadas no se diferenciaron del grupo control en población ni en mortandad, hay una tendencia favorable en ambos indicadores.

En relación a la producción de miel, las colmenas suplementadas produjeron entre un 18 y un 25% más de miel que las colmenas no suplementadas, aunque con un respaldo estadístico marginal. Estos valores de incremento de producción son muy importantes desde el punto de vista económico para el productor. Además, un cálculo realizado sobre costos/beneficios de suplementar con tortas de polen las colmenas previo al traslado a las forestaciones de *E. grandis* con valores correspondientes al segundo semestre de 2021, arroja un saldo netamente positivo de implementar este manejo. De todos modos, se requiere seguir aumentando el número de resultados productivos de colmenas suplementadas con polen en forestaciones de diferentes lugares y años para tener un rango de valores más amplio y confiable de los beneficios de este manejo, y así saber hasta qué punto la suplementación es rentable considerando diferentes costos y precios de la miel. En este sentido, los aportes de productores que incorporen este manejo serán muy valorados.

Por último, en este estudio no se pudo determinar el efecto de la suplementación en el nivel de infección por *N. ceranae* ya que este fue sumamente bajo. La baja incidencia de la nosemosis en las colmenas fue un resultado no esperado teniendo en cuenta los

estudios previos en forestaciones de *E. grandis*, donde las colmenas alcanzaban valores de infección muy elevados (Invernizzi et al., 2011; Mendoza et al., 2012, Mendoza et al., 2014a, Mendoza et al., 2014b, Branchiccela et al., 2019).

En suma, este primer estudio de la tesis mostró que la suplementación de colmenas trasladadas a forestaciones de *E. grandis* con tortas de polen polifloral puede tener un beneficio importante a nivel poblacional y productivo y justifica seguir explorando esta nueva pauta de manejo. Un futuro estudio debería contemplar la suplementación proteica con productos comerciales, de mejor acceso para el productor que el empleo de polen ensilado.

El segundo estudio de esta tesis (Capítulo 2) estuvo dirigido a analizar a nivel de campo cómo la suplementación con polen polifloral afectaba la respuesta inmune de las abejas, los niveles de expresión del gen que codifica para la vitelogenina, una lipoproteína de efectos pleiotrópicos amplios a nivel fisiológico, comportamental y estrés oxidativo, y los niveles de expresión del gen que codifica para la deterina, un inhibidor de la apoptosis celular. Este trabajo contaba con algunos antecedentes recientes de estudios realizados a nivel de laboratorio que mostraban que las abejas alimentadas con polen de buen valor nutricional mejoran la respuesta inmune e incrementan los niveles de expresión del gen que codifica para la vitelogenina (Alaux et al., 2010; Di Pasquale et al., 2013, Branchiccela et al., 2019; Castelli et al., 2020). En particular, el estudio de Castelli et al. (2020) realizado en Uruguay es valioso porque emplea polen de *E. grandis* como polen monofloral pobre en nutrientes y compara sus efectos con polen polifloral.

Los resultados encontrados mostraron que de todos los genes involucrados en la respuesta inmune solo el de la *glucosa oxidasa*, un componente de la inmunidad social, aumentó su expresión, mientras que no hubo cambios en la expresión de genes relacionados a la respuesta humoral y celular.

Un resultado interesante por su consecuencia a nivel poblacional y, quizás, productivo de forma indirecta, fue que las abejas de las colmenas suplementadas aumentaron de forma clara la expresión del gen que codifica para la vitelogenina. Uno de los efectos del aumento de los niveles de vitelogenina es que las abejas salen a pecorear más tarde y viven más tiempo (Amdam et al., 2012). Este resultado permitiría explicar por qué

en el estudio del Capítulo 1 las colmenas suplementadas con polen polifloral estaban más pobladas que las colmenas no suplementadas, aun cuando ambos grupos no se diferenciaron en el área de cría. La diferencia en población podría estar en que las abejas que disponían de polen diverso vivían más que las abejas que solo disponían del polen de *E. grandis*.

Por último, las abejas de las colmenas suplementadas con polen polifloral expresaron menos el gen *birc 5*, responsable de producir deterina, un inhibidor de la apoptosis celular. Este resultado muestra que las abejas que disponen de polen de pobre calidad, por ejemplo el polen de *E. grandis*, verían limitada su capacidad de recurrir a la muerte programada de células infectadas por *N. ceranae*, lo que beneficia la reproducción de este parásito. Esta podría ser una explicación, sin descartar otras, de por qué las colmenas que se alimentan con polen polifloral están menos infectadas por *N. ceranae* que las colmenas que solo disponen del polen de *E. grandis* como lo encontraron Invernizzi et al. (2011) y Branchiccela et al. (2019) en estudios en forestaciones y Castelli et al. (2020) con abejas confinadas en laboratorio.

Este estudio fue el primero a nivel de campo dirigido a estudiar el efecto de la calidad del polen en la respuesta inmune, los niveles de expresión de *vitelogenina* y de un inhibidor de apoptosis, empleando para ello un escenario natural como son las forestaciones de *E. grandis*, que reúne las condiciones para ideales para evaluar las consecuencias del estrés nutricional. Los resultados obtenidos, donde no inciden las limitaciones que tienen los estudios con abejas confinadas, pueden ser trasladables a otros contextos donde las abejas tienen restringida la oferta de pólenes variados, como pueden ser los monocultivos.

Finalizando, esta tesis muestra que la suplementación proteica de las colmenas que se trasladan a las forestaciones de *E. grandis* puede jugar un rol relevante para aumentar la producción de miel y reducir los despoblamientos. Por otro lado, se aportó por primera vez a nivel de campo, información sobre el impacto de la calidad del polen en la fisiología de las abejas. Este tema, hasta ahora abordado en experimentos muy controlados en el laboratorio, es fundamental para comprender cómo la falta de fuentes de polen, un problema creciente en el mundo, afecta individualmente a las abejas y en el funcionamiento de la colmena.

## 9. CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes que se desprenden de esta tesis son las siguientes:

1. El aporte de polen polifloral a las colmenas a lo largo del mes previo a su traslado a una forestación de *E. grandis* aumentó la población de abejas, pero no el área de cría, al momento del traslado y durante el período de floración de los eucaliptos.
2. El aporte de polen polifloral durante el período de floración de *E. grandis* a las colmenas que ya habían sido suplementadas previo al traslado a la forestación no contribuyó a mejorar la población de abejas ni el área de cría. Así, la suplementación de las colmenas previo al traslado a la forestación fue suficiente para aumentar la población de abejas.
3. Las colmenas suplementadas con polen polifloral produjeron entre 18 y 25% más miel de *E. grandis* que las colmenas no suplementadas, aunque este aumento tuvo un respaldo estadístico marginal.
4. El nivel de infección de las colmenas por *N. ceranae* al finalizar la floración de *E. grandis* fue sumamente bajo (entre 12000 y 23000 esporas por abeja) y no estuvo afectado por la disponibilidad de polen polifloral.
5. Las abejas de las colmenas suplementadas con polen polifloral aumentaron la expresión del gen que codifica para la glucosa oxidasa, un componente de la inmunidad social, pero no afectó la expresión de genes vinculados a la respuesta humoral y celular.
6. Las abejas de las colmenas suplementadas con polen polifloral aumentaron la expresión del gen que codifica para la vitelogenina, una glicolipoproteína con efectos pleiotrópicos en la maduración comportamental, fisiología, nutrición y estrés oxidativo. Teniendo en cuenta el efecto positivo de la suplementación en la población de las colmenas, es probable que este se deba a un aumento de la expectativa de vida de las abejas por aumento de la vitelogenina.
7. Las abejas de las colmenas suplementadas con polen polifloral redujeron la expresión del gen que codifica para la deterina, una molécula inhibidora de la apoptosis celular. Esta respuesta beneficiaría a las abejas ya que la apoptosis de células infectadas por *N. ceranae* limita la reproducción de este parásito.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6, 562–565.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri D. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. Aug; 3 (8):917-21.
- Amdam, G y 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, Ihle K y Page R. 2010. Regulation of honeybee worker (*Apis mellifera*) life histories by vitellogenin. *Hormones, Brain and Behavior Online*, 1003–1027.
- Amdam G, Fennern E y Havukainen H. 2012. Vitellogenin in Honey Bee Behavior and Lifespan. In: Galizia C., Eisenhardt D., Giurfa M. (eds.) *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Springer, Dordrecht.
- Amdam G y Omholt S. 2002. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216, 209–228.
- Anido M, Branchiccela B, Castelli L, Harriet J, Campá J, Zunino P y Antúnez K. 2016. Prevalence and distribution of honey bee pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 54, 532–540.
- Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P y Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11, 2284–2290.
- 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, Dalmon, A. 2020. Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 11, 239.
- Branchiccela, B, Castelli, L, Corona, M, Díaz-Cetti, S, Invernizzi, C, Martínez de la Escalera, G, Mendoza, Y, Santos, E, Silva, C, Zunino, P, Antúnez, K. 2019. Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Sci Rep* 9, 10156.
- Branchiccela B. 2019. Rol de la nutrición de la abeja *Apis mellifera* en la infección con los patógenos de mayor importancia apícola. Tesis de Doctorado. PEDECIBA-UDELAR.

- Branchiccela B, Antúnez K, Invernizzi C, Coll F. 2020. Apicultura en montes de Eucalyptus spp. Revista INIA n.º 62, 60-72.
- Brodschneider R, K Crailsheim. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278–294.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, P Tempst. 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.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, P Tempst. 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, P Tempst. 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-Josson K, Zhang W, Capaci T, P Casteels, P Tempst. 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 46, Issue of November 18, pp. 28569-28575, 1994 Printed in USA.
- Castelli L, Branchiccela B, Garrido M, Invernizzi C, Porrini M, Romero H, Santos E, Zunino P y Antúnez K. 2020. Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microbial Ecology*.
- CCU. 2021. Informes especiales sobre Agroalimentos elaborados por el Área Rural de CCU.
- Chang L, Barron A, Cheng K. 2015. Effects of the juvenile hormone analogue methoprene on rate of behavioural development, foraging performance and navigation in honey bees (*Apis mellifera*). *J Exp Biol*. 2015 Jun; 218(Pt 11):1715-24.
- Chen Y, Evans J, Smith I, Pettis J. 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.
- Crailsheim K. 1998. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 29, 97–112.
- Crailsheim K. 1992. The flow of jelly within a honeybee colony. *Journal of Comparative Physiology B*, 162, 681–689.

- Crane E. 1990. Bees and beekeeping: science, practice and world resources. P. in.: Heinemann Newnes, Oxford.
- Cremer S, Armitage S, Schmid-Hempel P. 2007. Social Immunity. *Current Biology*, 17, 693–702.
- Dainat B, Evans J, Chen Y, Gauthier L, Neumann P. 2012. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*, 7, e32151.
- De Groot A. 1953. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.). *Physiologia comparata et oecologia*, 3, 197–285.
- Delaplane K, Steen J, Van Der y Guzman-Novoa E. 2013. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1–12.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces L, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J y Alaux C. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, 8, 1–13.
- Doner L. 1977. The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 443–456.
- 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, 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.
- Ellis J, Evans J, Pettis J. 2010. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49, 134–136.
- Evans, J, Aronstein K, Chen Y, Hetru C, Imler J, Jiang H, Kanost M, Thompson G, Zou Z y Hultmark D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15, 645–656.
- 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. *J. Insect Physiol.* 28, 61-68.

- Fries I, Chauzat M, Chen Y, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon D, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, Paxton R, Tanner G, Webster T, Williams G. 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1–28.
- 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.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol. Mar*; 56 (Pt 3):501-511.
- Genersch E. 2010. Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 87–97.
- Gliński Z, Jarosz J. 1995. Mechanical and Biochemical Defences of Honey Bees. *Bee World*, Vol 76, issue 3, 110-118.
- De Groot A. 1953. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.). *Physiologia comparata et oecologia*, 3, 197–285.
- Haydak. 1970. Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology*, 15, 143–156.
- 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, González-Porto A, Barrios L, Del Nozal M, Bernal J, Jiménez J, Palencia P, Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659–2669.
- 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.
- Huang Z. 2012. Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terrestrial Arthropod Reviews*, Vol 5, Issue 2, 175-189.



- Invernizzi C, Santos E, García E, Daners G, Di Landro R, Saadoun A, Cabrera C. 2011. Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations. *Archivos de zootecnia*, 60, 1303–1314.
- Invernizzi C, Abud C, Tomasco 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.
- Klein, A, Vaissière, B, Cane, J, Steffan-Dewenter, I, Cunningham, S, 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, Kondos, A. 1976. Influence of crude protein levels on colony production. *Australasian beekeeper*, 36–39.
- Lavine, M, Strand, M. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1295–1309.
- Manning, R. 2001. Fatty acids in pollen: A review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82, 60–75.
- 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.
- 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.
- Mayack, C, Naug, D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100, 185–188.
- McGowan J, De la Mora A, Goodwin P, Habash, Hamiduzzaman M, Kelly P, Guzman-Novoa, E. 2016. Viability and infectivity of fresh and cryopre-served *Nosema ceranae* spores. *J Microbiol Methods* 131: 16–22.
- 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, Antúnez K, Branchiccela B, Anido M, Santos E, Invernizzi C. 2014a. *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie* 45: 224-234.
- Mendoza Y, Santos E, Antúnez K y Invernizzi C. 2014b. Selección bidireccional de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) para aumento de la resistencia y la susceptibilidad a la nosemosis. *Rev. Asoc. Ent. Arg.* 73: 65-69.
- MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 2018. Datos de superficie forestal. [En línea]. En: Resultados Cartografía Forestal Nacional 2018. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 26 de febrero 2020. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/resultados-cartografia-forestal-nacional-2018>.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2019. Producción de miel y producción por colmena según año. En: Anuario estadístico agropecuario. 2019. 256 pp.
- DIEA (Dirección de Investigaciones Económicas Agropecuarias). 2020. Anuario. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.
- OPYPA. 2020. Anuario. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.
- 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, Calderone, N. 2000. The value of honey bees as pollinators of U. S. Crops. *Bee Culture*, 1–15.
- Nanetti, A, Rodriguez-García, C, Meana, A, Martín-Hernández, R, Higes M. 2015. Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Res Vet Sci.* 2015 Oct. 102:167-72.
- Nappi, A, Christensen, B. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *InsectBiochem. Mol. Biol.* 35, 443–459.
- Naug, D, Gibbs, A. 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 40, 595–599.
- Nicolson, S. 2011. Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46, 197–204.
- Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, e45.

- Potts, S, Biesmeijer, J, Kremen, C, Neumann, P, Schweiger, O, Kunin, W. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology y Evolution*, 25, 345–353.
- Potts, S, Imperatriz-Fonseca, V, Ngo, H, Biesmeijer, J, Breeze, T, Dicks, L, Garibaldi, L, Hill, R, Settele, J, Vanbergen, A, Aizen, M, Cunningham, S, Eardley, C, Freitas, B, Gallai, N, Kevan, P, Kovács-Hostyánszki, A, Kwapong, P, Li, J, Li, X, Martins, D, Nates-Parra, G, Pettis, J, Rader R, 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.
- Prado, A, Requier, F, Crauser, D, Le Conte, Y, Bretagnolle, V, Cédric A. 2020. Honeybee lifespan: the critical role of pre-foraging stage. *Royal Society open sci.*
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA  
URL <http://www.rstudio.com/>.
- Requier, F, Antunez, K, Morales, C, Aldea, P, Castilhos, D, Garrido, P, Giacobino, A, Reynaldi, F, Rosso Londono, J, Santos, E, Garibaldi, L. 2018. Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*, 57.
- Roberts, K.; Evison, S.; Baer, B. y W. Hughes. 2015. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Sci Rep* 5, 10982 (2015).
- 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.
- Schmickl, T. y 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.
- Simone-Finstrom, M, Foo, B., Tarpy, D, Starks, P. 2014. Impact of food availability, pathogen exposure, and genetic diversity on thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Behav* 27: 527-539.

- Simpson, S, Raubenheimer, D. 2012. The nature of nutrition: A unifying framework from animal adaptation to human obesity Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- SINATPA. 2020. Informe de Datos del Sistema Nacional de Trazabilidad de Productos Apícolas. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.
- Somerville, D. 2001. Nutritional value of bee collected pollens. Rural Industries Research and Development Corporation, 1–166.
- Somerville, D, Nicol, H. 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.
- Stokstad, E. 2007. The Case of the Empty Hives. *Science*, Vol 36, 970-972.
- Strand, M. 2008. Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Immunology*, Vol. 32, 35-47.
- Tokarev, Y, Huang, W, Solter, L, Malysh, J, Becnel, J, Vossbrinck, C. 2020. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J Invertebr Pathol* [Internet]. 2020; 169 (August 2019):107279.
- van Dooremalen, C, Stam, E, Gerritsen, L, Cornelissen, B, van der Steen, J, van Langevelde, F, Blacquièrre, T. 2013. Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of Insect Physiology*, Vol 59, Issue 4, 487-493.
- vanEngelsdorp, D, Meixner, M. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S80–S95.
- Vargas-Albores, F, Ortega-Rubio, A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y posgrado*, Vol IV, Issue 1, 21-28.
- 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, S80–S95.
- Vargas-Albores, F, Ortega-Rubio, A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y posgrado*, Vol IV, Issue 1, 21-28.

- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP, Delbac F. 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*. 2011; 6 (6): e21550.
- Wilhm, J, Dorris T. 1968. Biological parameters of water quality. *Bioscience* 18: 447- 481.
- Winston M. 1987. The biology of the honey bee. Cambridge: Harvard University Press. 294 p.
- Weinstock, G, Robinson, G, Gibbs, R., Weinstock, G, Weinstock, Robinson, G, Worley, K, Evans, J, Maleszka, R., Robertson, H, Weaver, D, Beye, M, Bork, P, Elsik, C, Evans, D., Hartfelder, K., Hunt, G, Robertson, H, Robinson, G, Maleszka, R, Weinstock, G, Worley, K, Zdobnov, E, Hartfelder, K, Amdam, G, Bitondi, M, Collins, A, Cristino, A, Evans, J, Michael, H, Lattorff, G, Lobo, C, Moritz, R, Nunes, F, Page, R, Simões, Z, Wheeler, D, Carninci, P, Fukuda, S, Hayashizaki, Y, Kai, C, Kawai, J, Sakazume, N, Sasaki, D, Tagami, M, Maleszka, R, Amdam, G, Albert, S, Baggerman, G, Beggs, K, Bloch, G, Cazzamali, G, Cohen, M, Drapeau, M, Eisenhardt, D, Emore, C, Ewing, M, Fahrbach, S, Forêt, S, Grimmelikhuijzen, C, Hauser, F, Hummon, A, Hunt, G, Huybrechts, J, Jones, A, Kadowaki, T, Kaplan, N, Kucharski, R, Lebouille, G, Linial, M, Littleton, J, Mercer, A, Page, R, Robertson, H, Robinson, G, Richmond, T, RodriguezZas, S, Rubin, E, Sattelle, D, Schlipalius, D, Schoofs, L, Shemesh, Y, Sweedler, J, Velarde, R, Verleyen, P, Vierstraete, E, Williamson, M, Beye, M, Ament, S, Brown, S, Corona, M, Dearden, P, Dunn, W, Elekonich, M, Elsik, C, 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.
- Wong, C, Wong, K, Chen, X. 2008. Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 78, Issues 6, 927-938.
- Zamora, J, Otárola, I, Brenes, O. 2005. Apoptosis and its relationship with diverse nutrients. *Rev. chil. nutr.* [online]. 2005, vol. 32, n.º 3, pp. 178-190.

### Referencias web

<http://sociedadapicolauruguay.uy/>.

## **11. ANEXOS**

### **11.1. APÉNDICE 1: IMPLEMENTACION DE LA SUPLEMENTACION CON TORTAS DE POLEN POLIFLORAL, CÁLCULO COSTO Y BENEFICIO**

Tabla 1. Cálculos de costos y beneficios de implementar la suplementación con tortas de polen polifloral. Se encuentran los datos relevantes para realizar el cálculo, la información necesaria para calcular los costos de elaboración de la torta y, a continuación, el cuadro con la información pertinente sobre cuánta miel extra podría obtener un productor de aplicar la suplementación con tortas de polen. En la parte inferior de la imagen, la ganancia que obtendría un productor que tiene un apiario de veinte colmenas.

Datos relevantes
Precio del dólar U\$S 43,32
Precio kg miel U\$S2,5
9 kg de polen + 600 sacarosa= 18 tortas de 500gr
Obtención de 100 cuadros= 4 horas=\$200xhora
Obtención de 100 tortas=8 horas=\$200xhora
Preparar material de nuevo 100 cuadros=4 horas=\$200xhora

1 cuadro de polen pesa 800grs-----9000gs de polen corresponden a 11,25 cuadros
100 cuadros se hacen en 240 min-----11,25 cuadros=27min
100 tortas se hacen en 480 min-----18 tortas se hacen en 86,4 min
100 cuadros se hacen en 480 min-----11,25 cuadros=54 min

Gasto realización de las tortas (U\$S)*		
Jornales, materiales e ingredientes requeridos	Unidades	Costo total U\$S
Azúcar (para la elaboración de la torta)	2	2,12
Panal (compra de material que se rompe)	11,25	3,825
Obtención de los cuadros (hora de trabajo)	27min	5,856832972
Elaboración de 18 tortas (hora de trabajo)	86,4 min	18,74186551
Preparar el material nuevamente (hora de trabajo)	54min	11,71366594
<b>Total de preparación</b>		<b>42,3</b>
<b>Costo elaboración de una torta</b>		<b>1</b>

\*Se calcula en base a la realización de 18 tortas

Producción de miel			
Grupo experimental	Producción de miel *	Producción extra de miel por suplementar	Ganancia x colmena (U\$S)
Sin suplementar (Grupo A)	28		
Suplementado antes del traslado (Grupo B)	35	7	17,5
Suplementado en todo momento (Grupo C)	33,5	5,5	13,75

\*Promedio observado en este ensayo, con apiarios con 20 colmenas cada uno

Ganancia (U\$S)		
Apiario de 20 colmenas	Suplementación previa al traslado	Suplementación previa y durante el traslado
Ganancia en producción de miel por colmena	350	275
Costo tortas	20	40
Ganancia cada 20 colmenas	330	235

## 11.2. APÉNDICE 2: *PRIMERS* UTILIZADOS EN EL ENSAYO 2

Tabla 2. *Primers* utilizados en el ensayo dos de esta tesis

Secuencia blanco	Secuencia primers 5'-3'	Temperatura de annealing	Referencia
<i>Vitelogenina</i> -F	AGTTCCGACCGACGACGA	52°C	Johnson et al., 2009
<i>Vitelogenina</i> -R	TTCCCTCCCACGGAGTCC		
<i>Himenopectina</i> -F	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	52°C	Evans, 2006
<i>Himenopectina</i> -R	GCGTCTCCTGTCATTCCATT		
<i>Profenol oxidasa</i> -F	TAATTGCGAACGGCTATGTAATCGTCT	60°C	Corona com. pers.
<i>Profenol oxidasa</i> -R	ACTGGCAACAAGGGAATCTAATTCGG		
<i>B-actina</i> -F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	50°C	Yang y Cox-Foster, 2005
<i>B-actina</i> -R	GACCCACCAATCCATACGGA		
<i>Proteína ribosomal S5</i> -F	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	50°C	Evans, 2006
<i>Proteína ribosomal S5</i> -R	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA		
<i>Glucosa oxidasa</i> -F	GAGGGCGGAAAATCATCAGACC	59°C	Alaux y col., 2010
<i>Glucosa oxidasa</i> -R	AGGATTACCCGAGATCACCTGC		
<i>Deterina</i> -F	CTTCTGACACTTCGTGCAATCC	60°C	Martínez-Hernández y col., 2017
<i>Deterina</i> -R	GGGTTCTTTCTACCACCCACTAC		



### **11.3. APÉNDICE 3: DOES POLYFLORAL POLLEN SUPPLEMENTATION IN HONEY BEES AFFECT THE IMMUNITY OF COLONIES UNDER NUTRITIONAL STRESS IN A *EUCALYPTUS GRANDIS* FOREST?**

Artículo a ser publicado en la revista *Agrociencia Uruguay*.

#### Summary

Pollen consumed by bees varies throughout their lives. This variation is accompanied by changes in physiology and anatomy. Nutrition with different pollens affects the life expectancy of bees, their immunocompetence, their resistance to pathogen infection and their behavior.

Afforestations of *E. grandis* exploited by beekeepers during the autumn flowering season for their large supply of nectar and pollen are an ideal natural scenario to study the impact of nutrition on bees. In these monocultures, bees are exposed to strong nutritional stress due to the availability of a single main species of nutritionally poor pollen and to the fact that they are subjected to intense activity at a time when the hive should be preparing for overwintering. This has an impact at the sanitary level, increasing the levels of infection with *N. ceranae*. Under these conditions, the weakening of the hives towards the end of *E. grandis* flowering is notorious. One of the proposed mechanisms to mitigate hive weakening is by supplementing them with polyfloral pollen. The objective of this study was to evaluate the effect of hive supplementation with polyfloral pollen cakes on the expression level of genes related to bee nutritional status, humoral, cellular and social immunity, apoptosis, and longevity.

#### Resumen

El polen consumido por las abejas varía a lo largo de su vida. Esta variación se acompaña de cambios en la fisiología y la anatomía. La nutrición con diferentes pólenes afecta la esperanza de vida de las abejas, su inmunocompetencia, su resistencia a la infección por patógenos y su comportamiento.

Las forestaciones de *E. grandis* explotadas por los apicultores durante la floración otoñal por su gran aporte de néctar y polen son un escenario natural ideal para estudiar el impacto de la nutrición en las abejas. En estos monocultivos, las abejas están expuestas a un fuerte estrés nutricional debido a la disponibilidad de una sola especie principal de polen nutricionalmente pobre y al hecho de que están sujetas a una intensa actividad en un momento en que la colmena debería estar preparándose para pasar el invierno. Esto tiene un impacto a nivel sanitario, aumentando los niveles de infección por *N. ceranae*. En estas condiciones, es notorio el debilitamiento de las colmenas hacia el final de la floración de *E. grandis*. Uno de los mecanismos propuestos para mitigar el debilitamiento de las colmenas es suplementándolas con polen polifloral. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de colmenas con tortas de polen polifloral sobre el nivel de expresión de genes relacionados con el estado nutricional de las abejas, inmunidad humoral, celular y social, apoptosis y longevidad.

#### Resumo

O pólen consumido pelas abelhas varia ao longo de suas vidas. Essa variação é acompanhada por mudanças na fisiologia e na anatomia. A nutrição com diferentes pólenes afeta a expectativa de vida das abelhas, sua imunocompetência, sua resistência à infecção por patógenos e seu comportamento.

Florestas de *E. grandis* exploradas por apicultores durante a estação de floração do outono por sua grande oferta de néctar e pólen são um cenário natural ideal para estudar o impacto da nutrição nas abelhas. Nessas monoculturas, as abelhas estão expostas a um forte estresse nutricional devido à disponibilidade de uma única espécie principal de pólen nutricionalmente pobre e ao fato de serem submetidas a intensa atividade no momento em que a colmeia deveria estar se preparando para a hibernação. Isto tem um impacto a nível sanitário, aumentando os níveis de infecção com *N. ceranae*. Nestas condições, é notório o enfraquecimento das colmeias no final da floração de *E. grandis*. Um dos mecanismos propostos para mitigar o enfraquecimento das colmeias é suplementá-las com pólen polifloral. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação da colmeia com bolos de pólen poliflorais sobre o nível de expressão

de genes relacionados ao estado nutricional das abelhas, imunidade humoral, celular e social, apoptose e longevidade.

## **1. Introduction**

### **1.1. Bee Nutrition**

Colony survival and production is directly dependent on the quality (chemical composition) and total amount of nutrients consumed (Simpson y Raubenheimer, 2012).

Carbohydrates, proteins, lipids, vitamins and minerals available to honey bees influence the quantity of progeny produced, adult longevity and health, and colony survival and productivity (Brodschneider y Crailsheim, 2010). Colonies faced with a lack of essential nutrients cease brood production and may not survive if these nutrients are not obtained (Brodschneider y Crailsheim, 2010; Huang, 2012). Furthermore, the abundance and diversity of botanical resources also impacts the immune system and the gut microbiota composition of bees (Alaux et al., 2010; Branchiccela et al., 2020, Castelli et al., 2020).

Pollen consumption by bees varies throughout their life cycle. This variation is accompanied by changes in physiology associated with the production of enzymes with proteolytic activity and changes in anatomy linked to the development of hypopharyngeal glands and fatty bodies (Moritz y Crailsheim, 1987).

Brodschneider y Crailsheim (2010) propose three levels of nutrition: colony, adult bees, and larvae. Disorders produced at lower levels will affect the following levels and vice versa. These nutritional levels are connected by trophallaxis (Brodschneider y Crailsheim, 2010).

Larvae and adults are highly dependent on the food reserves of the colony, adult bees can adapt their foraging activity or their care strategy according to the existing carbohydrate and protein needs (Schmickl y Crailsheim, 2004). Thus, nutritional requirements at the individual level have a major impact on colony development and behavior.

## **1.2. Social and Individual Immunity**

In order to face different parasites and pathogens, honey bees present different immunity mechanisms at the social and individual level (Cremer et al., 2007; Evans et al., 2006). At the social level, behaviors such as grooming, nest hygiene, and resin collection for nest disinfection are triggered (Cremer et al., 2007; Gliński y Jarosz, 1995). Other social behaviors are the protection of the queen and the removal of infected brood by nurse bees (hygienic behavior) (Simone-Finstrom et al., 2014), as well as the transfer of antimicrobial peptides directly to the brood through feeding (Cremer et al., 2007). In addition, various mechanisms of individual immunity are found to combat infection with pathogens, including physical barriers such as the exoskeleton or peritrophic membrane, and humoral and cell-mediated immunity (Evans et al., 2006). The humoral level includes defenses such as the production of antimicrobial peptides such as Defensin (Casteels-Josson et al., 1994), Abaecin (Casteels et al., 1990), Hymenothecin (Casteels et al., 1993) and Apidecin (Casteels et al., 1989). The cellular immune response includes the action of different hemocytes which carry out phagocytosis, nodulation and encapsulation processes (Strand, 2008).

## **1.3. Nutritional Stress and Supplementation with Polyfloral Pollen**

The intensification of agricultural production has greatly deteriorated beekeeping areas. This fact, together with the increase in colony losses and the decrease in production yields, has stimulated beekeepers to look for alternatives to maintain or increase honey production. In this context, there has been an increase in the mobility of colonies relocated to *E. grandis* afforestations between the months of February and May. At this stage of the year the floral supply decreases significantly in most of the environments of the country. Although colonies in *E. grandis* afforestations increase their production considerably, they weaken considerably towards the end of the flowering period, and run the risk of not surviving the winter. This weakening could be due to increased infection with *N. ceranae* (Mendoza et al., 2013, 2012), the stress of undergoing intense activity at a time of year when the hive should be preparing for overwintering, and bee malnutrition due to the availability of one main source of pollen

(Invernizzi et al., 2011). Colony losses can be of such a magnitude that the economic benefit of hive relocation to *E. grandis* afforestations can be greatly reduced.

Previous studies showed that, under these conditions, the availability of polyfloral pollen reduces *N. ceranae* infection (Branchiccela et al., 2019; Invernizzi et al., 2011). In addition, supplementation of colonies with polyfloral pollen cakes increases the number of bees and brood (Branchiccela et al., 2019). However, in these trials, supplementation had no consequences on honey production. This could be due to the fact that larvae fed during supplementation with polyfloral pollen started to forage 30-35 days after the colonies were placed in the monoculture, by which time nectar availability had already decreased (Belén Branchiccela, personal communication).

The objective of this study was to evaluate the effect of supplementing hives with polyfloral pollen cakes on the level of expression of genes related to bee nutritional status, humoral, cellular and social immunity, apoptosis, and longevity, and on the levels of infection with the microsporidium *Nosema ceranae*.

## **2. Methods**

### **2.1. Hives Used**

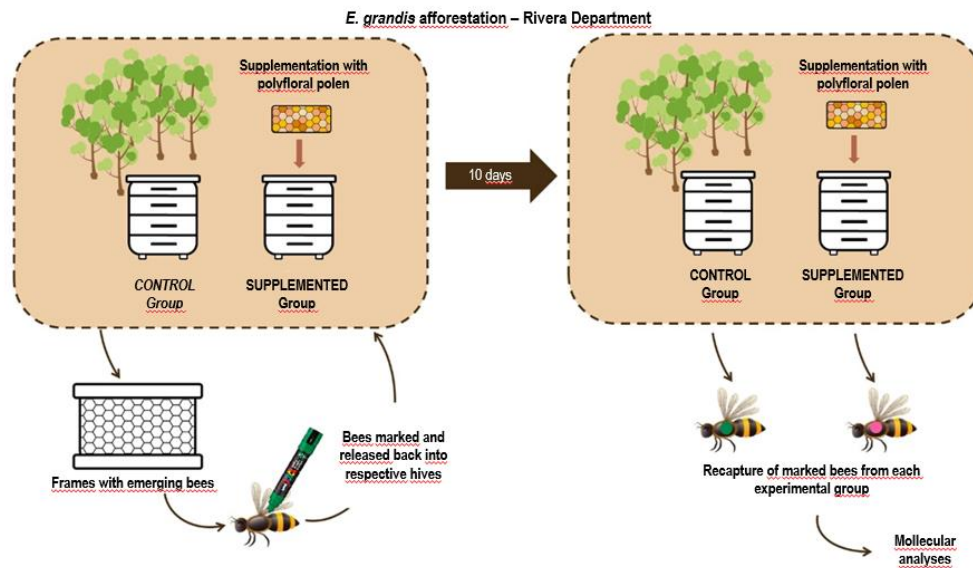
During the spring-summer of the 2017-2018 season, hives with sister queens were prepared at the INIA La Estanzuela Experimental Station (department of Colonia). All hives were treated with an organic acaricide (oxalic acid on cardboard strips) at the beginning of the experiment to reduce infestation by the *Varroa destructor* mite. Prior to the start of the trial, hives were standardized in 8 brood frames, one frame with a stamped wax sheet and one frame with honey. Subsequently, they were divided into two groups according to the treatment to be received: a control group formed by 20 hives that did not receive pollen supplementation, and the supplemented group formed by 19 hives which received polyfloral pollen prior to the transfer to an *E. grandis* afforestation and during the whole period of permanence in the afforestation.

One month after the start of supplementation, the two hive groups were relocated to an *E. grandis* afforestation in the department of Rivera (-31,347, -55,714). These hives

were maintained in the afforestation for approximately two and a half months (Figure 1).

One month after the hives were relocated (April 3), when the *E. grandis* were in full bloom, three hives from the control group and three hives from the supplemented group were randomly selected. Although the selection was random, the population and performance of these hives were checked to verify they were similar to that of the rest of the hives in the experimental group. From each hive, frames containing operculated brood ready to emerge were taken. The bees emerged in the following hours (approximately 90 bees per hive) were marked on the thorax with Uniposca marker, assigning different colors to the bees in the hives of each group. After being marked, the bees were reintroduced the same day to their respective hives, and 10 days later a minimum of 9 bees were recovered from each hive. The bees were kept alive until they reached the IIBCE Microbiology Department where they were sacrificed at  $-80^{\circ}$  in order to preserve their mRNA for molecular analysis. The procedure performed in this assay is detailed in Figure 1.

Figure 1. Representative diagram of the procedures carried out on the experimental groups.



## 2.2. Genes Analyzed

The effect of supplementation on the cellular and humoral immune response, as well as the nutritional and social immunity status of bees was evaluated.

For this purpose, the expression of the following genes was analyzed:

- 1) Gene coding for Hymenoptecin: antimicrobial peptide. (Casteels et al., 1993).
- 2) Gene coding for Pro phenoloxidase: protein that is part of the phenoloxidase cascade, whose activation leads to the formation of melanin (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994). This gene was used as a parameter of cellular immune response.
- 3) Gene coding for Vitellogenin: phosphoglycolipoprotein, main protein transporter through the hemolymph (Johnson et al., 2009). This gene was used as an indicator of bee nutritional status, physiological condition, and longevity.
- 4) Gene coding for Glucose oxidase: enzyme involved in the formation of hydrogen peroxide (antiseptic) (Alaux et al., 2010). This gene was used as a parameter of social immunity.

- 5) Gene coding for Deterin: protein member of the apoptosis inhibitor family (Ambrosini et al., 1997).

### **2.3 Analysis of Honeybee Immune Response by qPCR**

Nine bees from each of the three hives belonging to the control and supplemented groups were homogenized individually. Each bee was homogenized in tubes with ceramic beads with a lysis buffer (Qiagen) for 1 minute at 5.5 rpm in a FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA). RNA was then extracted using the commercial RNeasy Plus kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Co-extracted DNA was digested with DNase I (Invitrogen) and subsequently the RNA was retrotranscribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. The cDNA obtained was used to analyze the expression of the previously mentioned genes (hymenoprotein, prophenoloxidase, vitellogenin, glucose oxidase and deterin), using primers described in the literature (Table 2). PCR reactions consisted of 10 µl of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µM of each primer (Table 3) and 2 µl of cDNA in a final volume of 20 µl. The cycling program consisted of 10 min. at 95 °C (preincubation), 40 cycles of 15 sec. at 95 °C (amplification), 30 sec. at annealing temperature (this temperature varies depending on the primers used, detail in Table 2 of Appendix 1), 30 sec. at 60 °C, 65 sec. at 95 °C (melting curve) and 4 °C (cooling). The reactions were performed in a CFX96 Touch™ Real Time PCR System thermocycler (Biorad®).

The geometric mean of the expression of  $\beta$ -actin RPS5 (Table 2 in Appendix 1) - constitutively expressed genes of the honey bee - was used to normalize the data. In order to obtain the efficiencies of each reaction, a standard curve was constructed using serial dilutions (1/10) of one of the DNA samples. The relative expression level of the different genes was determined by the Pfaffl method (Pfaffl, 2001), using the control group (unsupplemented) as the calibrator group.



#### **2.4 Analysis of Infection with *Nosema ceranae***

The level of infection with *N. ceranae* was determined by optical microscopy and real time PCR. For microscopy determination, the abdomen of 60 bees collected from the supers was homogenized with 60 ml of sterile distilled water at maximum power for 120 seconds in a Stomacher (Seaward). Spore counting was then performed under an optical microscope using a Neubauer chamber (Fries et al., 2013).

For the determination of infection level by real time PCR, ten-day-old bees (which had been marked when recently emerged) belonging to hives of the control and supplemented groups were used. Each bee was homogenized individually in 600 µl of lysis buffer (Qiagen), using 9 bees per hive (3 hives from the control group and 3 hives from the supplemented group, 27 total bees per group). RNA extraction was performed using the RNeasy Plus kit (Qiagen), the co-extracted DNA was digested with DNase I (Invitrogen) and the RNA obtained was retrotranscribed to cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommendations. The level of infection of *N. ceranae* per bee was determined by qPCR using specific primers for the gene coding for protein 3 of the polar filament of this microorganism (PTP3, Xu and Weiss, 2005). PCR reactions consisted of 10 µl of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µM of each primer (Table 1) and 2 µl of cDNA in a final volume of 20 µl.

#### **2.3. Statistical Analysis**

Generalized linear mixed models (GLMM) were used to evaluate the effect of polyfloral pollen supplementation on the expression of genes linked to bee nutritional status and immune response. Gene expression ratio was used as a response variable, the experimental treatment as fixed variable and the hive to which the bees belonged as random variable. Gamma distribution and the log connection function were used for these analyses. A confidence level of 95% was considered and R Studio software (R Studio Team, 2016) was used.

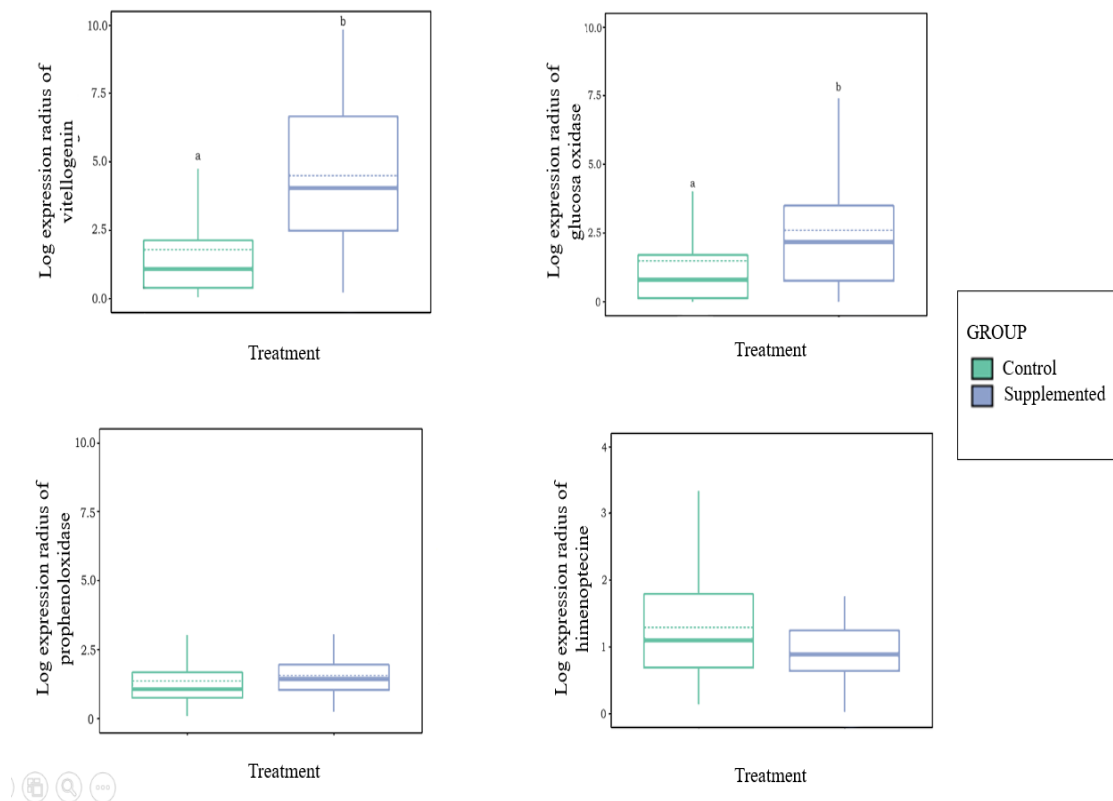
Data of *Nosema ceranae* infection levels met parametric statistical assumptions, thus, differences between groups were analyzed using the ANOVA test and subsequently

the Scheffé test (`{agricolae}` package) (R Studio Team, 2016). A confidence level of 95% was considered.

### 3. Results

Bees supplemented with polyfloral pollen showed higher expression of vitellogenin and glucose oxidase genes compared to control bees (GLMM, vitellogenin:  $p=0.012$ , glucose oxidase:  $p=0.014$ ) (Figure 2).

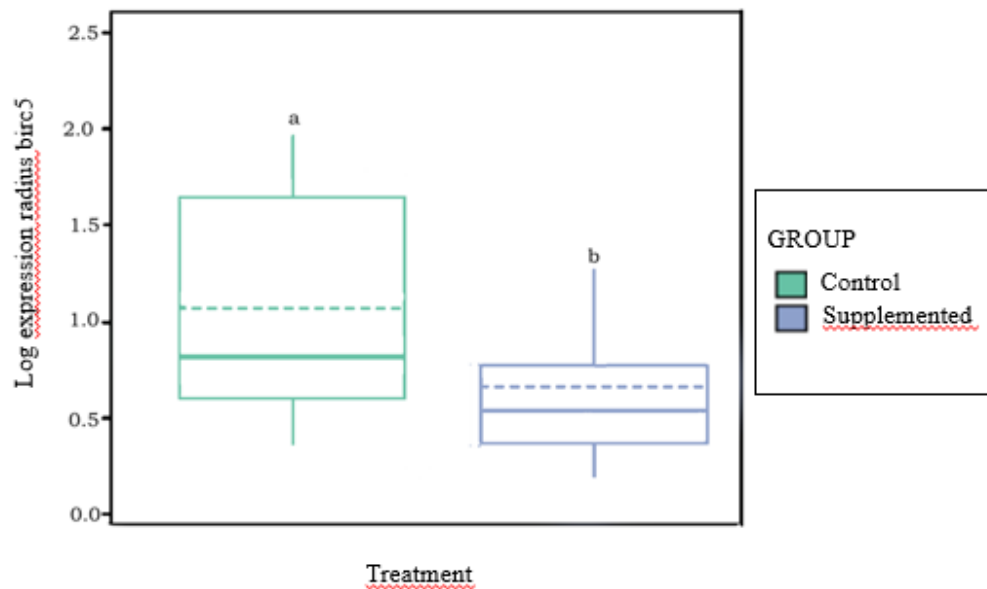
Figure 2. Expression radius of genes coding for vitellogenin (top left), glucose oxidase (top right), pro-phenoloxidase (bottom left) and hymenoptecine (bottom right), in the CONTROL group (hives that did not receive pollen cakes) and in the SUPPLEMENTED group (hives that received pollen cakes every 15 days, during the month prior to relocation and during the whole period within the afforestation). Boxplots show minimum and maximum data, 25th and 75th percentiles, mean and median. Different letters indicated show statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ). Analyses performed with Generalized Linear Mixed Models (GLMM).



On the other hand, the expression of hymenopthecin and pro-phenoloxidase genes was similar in both groups (GLMM hymenopthecin:  $p=0.372$ , pro-phenoloxidase:  $p=0.75$ ) (Figure 9; Table 3). Finally, bees supplemented with polyfloral pollen presented a lower expression of the gene associated with cell apoptosis, *birc5*, compared to bees in the control group (GLMM, *deterin*:  $p=0.004$ ) (Figure 3).

Figure 3. Expression radius of genes coding for *Deterin* in the CONTROL group (hives that did not receive pollen cakes) and in the SUPPLEMENTED group (hives that received pollen cakes every 15 days, during the month prior to translocation and during the whole period within the afforestation). Boxplots show minimum and maximum data, 25th and 75th percentiles, mean and median.

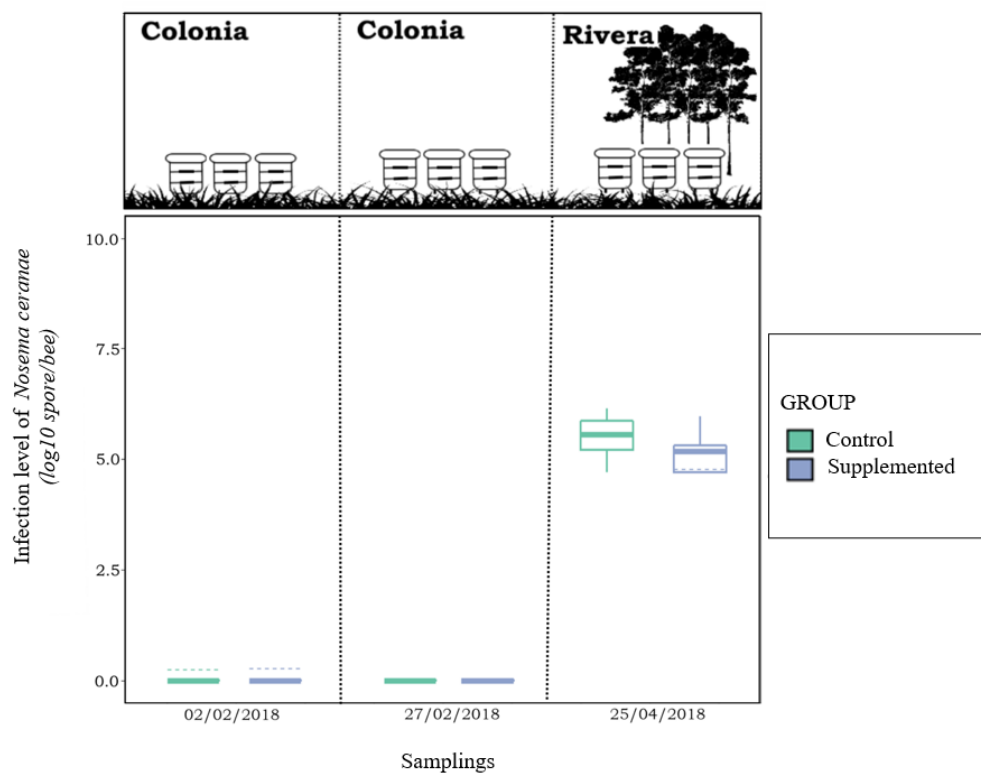
Different letters indicated show statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ). Analyses performed with Generalized Linear Mixed Models (GLMM).



According to the analysis by optical microscopy, hives showed very low levels of infection with *N. ceranae*, being similar among the different groups of hives (ANOVA,  $p=0.481$ ), both for samples taken at the beginning of the trial and one month after the

application of the different treatments. However, towards the end of their stay in the afforestation (when the *E. grandis* bloom had ended), practically all hives were found to be infected with this microsporidium. However, infection levels were low, with an average value of 23,000 spores/bee for the control group and 12,000 spores/bee for the supplemented group. These differences were not statistically significant (ANOVA,  $p=0.229$ ) (Figure 4).

Figure 4. Number of spores of *N. ceranae* per bee for samples 1, 2 and 3 in the CONTROL group (hives that did not receive pollen cakes) and in the SUPPLEMENTED group (hives that received pollen cakes every 15 days, during the month prior to translocation and during the whole period within the afforestation). Boxplots show minimum and maximum data, 25th and 75th percentiles, mean and median.



The analyses of the level of infection with *N. ceranae* by qPCR were similar to those obtained by light microscopy. The presence of this microsporidium was found only in 4 bees of the control group and 3 bees of one hive of the supplemented group, with no statistically significant differences in the level of infection between the hives of both groups (t. test,  $p=0.377$ ).

#### **4. Discussion**

In recent years, several studies in controlled laboratory conditions have shown that the type of protein diet (in terms of pollen diversity) affects bee humoral, cellular, and social immune response (Alaux et al., 2010; Di Pasquale et al., 2013). This association is difficult to study under field conditions due to the multiplicity of factors affecting bee colonies. However, *E. grandis* afforestations are a favorable environment for analyzing the impact of nutritional stress on the expression of bee immunity genes under field conditions, as they leave aside certain undesired variables that could affect gene expression, such as exposure to pesticides (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019; Branchiccela et al., 2020).

This study aimed to evaluate the effect of polyfloral pollen supplementation on the humoral and social cellular immune response, nutritional status, longevity, and oxidative stress of bees in field conditions.

Expression levels of vitellogenin were significantly higher in the bees of the supplemented group compared to those of the bees of the control group. This result shows that bees in the supplemented hives had a better nutritional status than bees that had mainly *E. grandis* pollen available. Similar results were found by Castelli et al. (2020) in a laboratory study with confined bees. Furthermore, higher levels of this protein have been reported to be associated with increased bee longevity (Amdam et al., 2012).

As for glucose oxidase, a higher expression level of this gene was observed in the group of supplemented hives compared to the control group, coinciding with what was reported by Alaux et al. (2010) and Castelli et al. (2020) in laboratory conditions. These authors proposed that the close relationship between the expression of this gene and the protein diet to which bees are subjected to could indicate that bees invest more

resources in social immunity than in individual immunity. These results are consistent with the fact that honeybees possess only one third of the immune response genes described for solitary insects (Gibbs et al., 2006), highlighting the importance of social response mechanisms to parasites and pathogens in colony survival (Evans et al., 2006, Cremer et al., 2007).

The expression of Deterin, a protein encoded by the *birc5* gene that inhibits apoptosis (Zamora et al., 2005), was significantly lower in bees belonging to supplemented hives. This mechanism is manipulated by *N. ceranae* to avoid premature cell death and consequently maximize its reproduction (Martín Hernández et al., 2018). Considering the marginal differences in *N. ceranae* infection between control and supplemented hives, it is more likely that the differences in observed *birc5* levels are mainly due to differences in pollen availability, and not so much to a possible effect of the parasite. In this context, possibly the better nutritional status of supplemented bees facilitates the availability of cellular resources to deploy a complex defense response to limit infection with the microsporidium, and under these conditions the manipulation of the immune system by *N. ceranae* is minimized.

On the other hand, the immune response mediated by Hymenopthecin has been reported as a general mechanism against infection with pathogens (Doublet et al., 2017) and in particular for *N. ceranae* (Branchiccela et al., 2020). In addition, hives supplemented with polyfloral pollen have been reported to have lower levels of infection with *N. ceranae* (Branchiccela et al., 2019). Under the conditions of this trial, we were unable to test these relationships, possibly due to the low levels of *N. ceranae* infection found. Apart from the fact that infection levels were very low, supplemented hives tended to be less infected and to have higher levels of hymenoprotein expression than hives in the control group. These results, together with the above-mentioned findings, suggest that bees with a better nutritional status would allow a higher Hymenopthecin-mediated immune response to be deployed as defence against *N. ceranae*. This hypothesis should be verified in a natural scenario with higher levels of infection with this microsporidium.

No differences were found in the expression of the humoral protein Profenol oxidase between bees fed with different types of pollen, coinciding with the findings of Alaux et al. (2010), di Pasquale et al. (2013) in laboratory conditions.

In the present study, infection levels of hives with *N. ceranae* while they remained in the afforestation were extremely low, unlike what was observed in previous studies (Invernizzi et al., 2011, Mendoza et al., 2012, Branchiccela et al., 2019). One possible explanation for this unexpected result is that in the year in which the study was conducted, conditions for the microsporidium to flourish were not present. The availability of diverse pollen contributes in maintaining low levels of *N. ceranae* infection (Invernizzi et al., 2011; Branchiccela et al., 2019; Castelli et al., 2020). Thus, a possible influx of diverse pollen in the days following the arrival of the hives may have been the reason for such low levels of infection. At the same time, the existence of factors related to the particular year in which fieldwork was carried out (year effect), which may have limited the multiplication of *N. ceranae*, cannot be ruled out.

Another possibility is that *N. ceranae* levels may also have been affected by the use of oxalic acid, a product used to control *V. destructor*, prior to hive relocation. Nanetti et al. (2015) reported that the use of oxalic acid in sucrose syrup under laboratory and field conditions decreases *Nosema* spp. infection levels at the individual and colonial levels. While control of *V. destructor* with oxalic acid administered from cardboard strips has not been shown to have an effect on *Nosema ceranae* infestation levels, it is a plausible hypothesis that merits future consideration.

In summary, this study showed that the supply of polyfloral pollen cakes triggers honey bee humoral and social immune responses in field conditions. Supplementation with polyfloral pollen generated a higher expression of the vitellogenin gene, giving the supplemented bees a better nutritional status and greater longevity. At the same time, the higher levels of glucose oxidase found in the supplemented group suggest that bees invest more resources in social immunity than in individual immunity.

## **5. Conclusions**

- 1- Bees from hives supplemented with polyfloral pollen increased the expression of the gene coding for Glucose oxidase, a component of social immunity, but did not affect the expression of genes linked to humoral and cellular responses.
- 2- Bees from hives supplemented with polyfloral pollen increased the expression of the gene coding for Vitellogenin, a glycolipoprotein with pleiotropic effects on behavioral maturation, physiology, nutrition and oxidative stress. Considering the positive effect of supplementation on the hive population, it is likely that this is a result of an increase in the life expectancy of the bees due to an increase in Vitellogenin.
- 3- Bees in hives supplemented with polyfloral pollen reduced the expression of the gene coding for Deterin, a molecule inhibiting cell apoptosis. This response would benefit the bees, since apoptosis of cells infected by *N. ceranae* limits the reproduction of this parasite.
- 4- The level of infection of hives by *N. ceranae* at the end of *E. grandis* flowering was extremely low (between 12000 and 23000 spores per bee) and was not affected by the availability of polyfloral pollen.

## **6. References**

- Alaux C, Ducloz F, Crauser D y Le Conte Y. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6, 562–565.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri D. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. Aug; 3 (8): 917-21.
- Amdam G, Fennern E y Havukainen H. 2012. Vitellogenin in Honey Bee Behavior and Lifespan. In: Galizia C., Eisenhardt D., Giurfa M. (eds.) *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Springer, Dordrecht.
- Branchiccela, B.; Castelli, L.; Corona, M.; Díaz-Cetti, S.; Invernizzi, C.; Martínez de la Escalera, G.; Mendoza, Y.; Santos, E.; Silva, C.; Zunino, P. y Antúnez, K. (2019) Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Sci Rep* 9, 10156.



Branchiccela B, Antúnez K, Invernizzi C y Coll F. 2020. Apicultura en montes de Eucalyptus spp. Revista INIA n.º 62, 60-72.

Brodtschneider R y Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41, 278–294.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F y 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.

Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M y 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 y 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-Josson K, Zhang W, Capaci T, Casteels P y Tempst P. 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, No. 46, Issue of November 18, pp. 28569-28575, 1994. Printed in USA.

Castelli L, Branchiccela B, Garrido M, Invernizzi C, Porrini M, Romero H, Santos E, Zunino P y Antúnez K. 2020. Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microbial Ecology*.

Cremer S, Armitage S. y Schmid-Hempel P. 2007. Social Immunity. *Current Biology*, 17, 693–702.

De Groot A. 1953. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.). *Physiologia comparata et oecologia*, 3, 197–285.

Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces L, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J y Alaux C. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, 8, 1–13.

Doner L. 1977. The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 443–456.

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, Le Conte Y, Manfredini F, McMahon D, Moritz R, Nazzi F, Niño E, Nowick K, van Rij R, Paxton R y Grozinger C. 2017. Unity in defence: Honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics*, 18, 207.

Evans, J, Aronstein K, Chen Y, Hetru C, Imler J, Jiang H, Kanost M, Thompson G, Zou Z y Hultmark D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15, 645–656.

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

Gliński Z y Jarosz J. 1995. Mechanical and Biochemical Defences of Honey Bees. *Bee World*, Vol 76, issue 3, 110-118.

De Groot A. 1953. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifica* L.). *Physiologia comparata et oecologia*, 3, 197–285.

Haydak. 1970. Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology*, 15, 143–156.

Huang Z. 2012. Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terrestrial Arthropod Reviews*, Vol 5, Issue 2, 175-189

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

Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., Soroker, V. y Higes, M. 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. P. in: *Environmental Microbiology*. 1302–1329 pp.

Mendoza, Y., Díaz, J., Ramallo, G. y 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.

Moritz, B. y Crailsheim, K. 1987. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 33, 923–931.

Nicolson, S. 2011. Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46, 197–204.

Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, e45.

Schmickl, T. y 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.

Simone-Finstrom, M., Foo, B., Tarpy, D. R., y Starks, P. 2014. Impact of food availability, pathogen exposure, and genetic diversity on thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Behav* 27: 527-539.

Simpson, S.J. y Raubenheimer, D. 2012. *The nature of nutrition: A unifying framework from animal adaptation to human obesity* Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Strand, M. 2008. Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Immunology*, Vol 32, 35-47.

Vargas-Albores, F. y Ortega-Rubio, A. 1994. El sistema inmune humoral de los insectos. *Tópicos de Investigación y posgrado*, Vol IV, Issue 1, 21-28.

Zamora, J., Otárola, I., Brenes, O. 2005. Apoptosis and its relationship with diverse nutrients. *Rev. chil. nutr.* [online]. 2005, vol.32, n.3, pp.178-190.