



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IMPACTO DEL IMIDACLOPRID EN LA SALUD DE LAS
ABEJAS MELÍFERAS**

Sofía Francisca Balbuena

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2022



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IMPACTO DEL IMIDACLOPRID EN LA SALUD DE LAS
ABEJAS MELÍFERAS**

Sofía Francisca Balbuena

PhD Pablo Zunino
Director

PhD Karina Antúnez
Co-directora

2022

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE LA DEFENSA DE TESIS

-Presidente. Gonzalo Suarez; Doctor en Medicina y Tecnología Veterinaria, PhD.

Área Farmacología, Departamento de Fisiología, Instituto de Biociencias.

Facultad de Veterinaria. UdelaR.

-Segundo Miembro. Laura Betancor; Licenciatura en Ciencias Biológicas, MS, PhD.

Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene.

Facultad de Medicina. UdelaR.

-Tercer Miembro. Ana Umpierrez; Licenciatura en Ciencias Biológicas, MS, PhD.

Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Ministerio de Educación y Cultura.



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
1986-2021

ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: PRESENCIAL Y PLATAFORMA ZOOM. Miércoles
30/03/22.

TRIBUNAL: Gonzalo Suárez, Laura Betancor, Ana Umpiérrez

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4682677-5	BALBUENA OVSEJEVI, SOFÍA FRANCISCA	SSS	12

TRIBUNAL

Gonzalo Suárez

Laura Betancor

Ana Umpiérrez

FIRMA

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecerles a todas aquellas personas que formaron parte de este proceso de formación y contribuyeron de manera directa o indirecta en la realización de esta tesis de Maestría.

Esta tesis se la quiero dedicar especialmente a mis abuelas Violeta y Blanca, quienes siempre me han dado su apoyo, contención y consejos desde que era una niña. A mis abuelos José y Héctor que aunque no se encuentren físicamente sé que siempre me están apoyando y guiando en cada cosa que me proponga.

A mi familia, en especial a mis padres, Karen y Héctor, quienes son mis principales pilares en la vida, muchas gracias por siempre creer en mí, escucharme y darme sus consejos.

A mis tutores, Karina y Pablo, por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme continuar con esta pasión que tengo por las abejas. A lo largo de esta maestría he podido adquirir nuevas herramientas que han contribuido a mejorar no solo mi calidad profesional sino humana.

A la colonia, en especial al grupo abejas el cual me ha ayudado en tareas dentro y fuera del laboratorio, necesarias para el desarrollo de mi maestría. Especialmente muchas gracias a Lore, Dani y Nati.

A mis amigas por estar siempre ahí, dándome ánimo y escuchándome a cualquier hora. Muchas gracias Flor, Fio, Euge, Pame, Mari, Viví y Vicky, gracias por el aguante en los momentos fáciles y también en los más difíciles.

A mis mascotas, que siempre formaron parte de mi familia, por tantas horas de escucharme repetir presentaciones, verme frente a la computadora por largas horas y aun así quedarse al lado mío dándome fuerzas para continuar. En especial a quienes ya no están Beto, Mateo y Violeta y a quien sigue estando Olivia.

A mi co-tutora de tesis de grado, Graciela, quien sigue creyendo en mí y estando al pendiente de mis avances académicos y al grupo HSP90.

A la ANII por permitirme realizar este posgrado al haberme otorgado una beca de maestría.

Muchas gracias a todos!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	9
2. ABSTRACT.....	10
3. INTRODUCCIÓN.....	11
3.1. Características de las abejas melíferas.....	11
3.1.1. Proceso de africanización en Uruguay.....	12
3.2. Importancia de la abeja <i>Apis mellifera</i>	13
3.3. Situación de la Apicultura en Uruguay.....	14
3.4. Pérdida de colonias de abejas melíferas.....	16
3.5. Principales patógenos de interés apícola.....	18
3.5.1. <i>Varroa destructor</i>	18
3.5.2. Virus.....	21
3.5.3. <i>Nosema</i> spp.....	25
3.6. Pesticidas y su impacto sobre las abejas melíferas.....	28
3.6.1. Neonicotinoides.....	29
3.6.2. Imidacloprid.....	33
3.7. Mecanismos defensivos de las abejas melíferas.....	35
3.7.1. Colectivos.....	36
3.7.2. Individuales.....	38
3.8. Microbiota intestinal de las abejas melíferas.....	40
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
5.1. Hipótesis.....	47
5.2. Objetivo general.....	48
5.3. Objetivos específicos.....	48
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
6.1. Estrategia experimental.....	48
6.2. Purificación de esporas de <i>Nosema</i> spp.....	49
6.3. Preparación de dosis subletales de imidacloprid.....	49
6.4. Diseño Experimental.....	50
6.5. Análisis de expresión de genes vinculados con la inmunidad y cuantificación del DWV.....	51
6.5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	51
6.5.2. PCR cuantitativa (qPCR).....	52
6.6. Análisis de la comunidad microbiana intestinal.....	53
6.6.1. Extracción de ADN de abejas melíferas.....	53
6.6.2. Secuenciación de amplicones de ARNr 16S.....	53
6.7. Cuantificación de esporas del microsporidio <i>Nosema ceranae</i>	54
6.8. Análisis estadísticos.....	54
6.8.1. Análisis de expresión de genes y cuantificación de DWV.....	54
6.8.2. Análisis de la microbiota intestinal.....	55
6.8.3. Análisis de la supervivencia de las abejas.....	56
7. RESULTADOS.....	56
7.1. Efecto del imidacloprid y/o <i>N. ceranae</i> sobre genes vinculados a la inmunidad de las abejas.....	56
7.2. Efecto del imidacloprid y/o <i>N. ceranae</i> sobre el nivel de infección con DWV.....	58
7.3. Efecto del imidacloprid y/o <i>N. ceranae</i> sobre la microbiota intestinal.....	59
7.4. Efecto del imidacloprid y/o <i>N. ceranae</i> en la supervivencia y Hazard ratio.....	63
7.5. Efecto del imidacloprid y/o <i>N. ceranae</i> en el consumo de jarabe.....	65
8. DISCUSIÓN.....	66
9. CONCLUSIONES.....	70
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Especies de abejas pertenecientes al género <i>Apis</i> : (1) <i>Apis mellifera</i> , (2) <i>Apis cerana</i> , (3) <i>Apis dorsata</i> , (4) <i>Apis florea</i>	11
Figura 2. Imagen en donde se observa una abeja africanizada (especimen oscuro) y una abeja europea (especimen más claro) sobre el panal.....	13
Figura 3. Número de colmenas y de apicultores en Uruguay (2010-2019).....	14
Figura 4. Producción de miel y número de colmenas en Uruguay (2010-2019).....	15
Figura 5. Exportación de miel en volumen y valor según país de destino.....	15
Figura 6. Exportaciones de productos apícolas por año (en kg).....	16
Figura 7. Representación esquemática de los múltiples factores estresantes que interactúan y que tienen un impacto negativo sobre la salud de las abejas melíferas.....	17
Figura 8. Distribución mundial del ácaro <i>Varroa destructor</i>	19
Figura 9. Ciclo de vida del ácaro <i>Varroa destructor</i>	20
Figura 10. Distribución mundial del virus DWV.....	23
Figura 11. Representación esquemática de rutas de transmisión de virus en abejas melíferas.....	24
Figura 12. Distribución mundial del microsporidio <i>Nosema ceranae</i>	27
Figura 13. Ciclo de vida de <i>Nosema ceranae</i>	28
Figura 14. Elementos estructurales de los neonicotinoides (A) y su clasificación en generaciones según su grupo heterocíclico (B).....	30
Figura 15. Rutas de exposición de las abejas melíferas a los neonicotinoides.....	32
Figura 16. Mecanismos defensivos colectivos utilizados por las abejas melíferas contra patógenos.....	36
Figura 17. Mecanismos defensivos individuales presentes en la abeja para combatir patógenos.....	39
Figura 18. Composición y organización espacial de las comunidades bacterianas en el intestino de la abeja melífera.....	41
Figura 19. Factores que influyen en la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas a lo largo de su desarrollo; fisiología, contacto social, dieta y el entorno del huésped.....	42
Figura 20. Diseño experimental del ensayo de toxicidad crónica.....	51
Figura 21. Expresión relativa de himenoptecina (A), lisozima (B), vitelogenina (C), glucosa oxidasa (D) y profenoloxidasa (E) en abejas melíferas recién emergidas intoxicadas con imidacloprid (0,001 mg/abeja) y/o infectadas por <i>N. ceranae</i>	57
Figura 22. Nivel de infección de DWV en abejas melíferas recién emergidas expuestas a imidacloprid (0,001 μ g/abeja) e infectadas por <i>N. ceranae</i> (A). Número de esporas de <i>N. ceranae</i> por abeja, en abejas melíferas expuestas a dosis subletales de imidacloprid (0,001 μ g/abejay 0,003 μ g/abeja) (B).....	58
Figura 23. Imagen representativa de gel de agarosa con los productos de amplificación por multiplex PCR del fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S de <i>Nosema ceranae</i> y <i>Nosema apis</i> utilizando cebadores específicos para estos microsporidios.....	59
Figura 24. Curvas de rarefacción observadas de ASV de comunidades bacterianas de diferentes tratamientos; jarabe (verde), <i>N. ceranae</i> (rojo), imidacloprid (azul) e imidacloprid + <i>N. ceranae</i> (celeste).....	60
Figura 25. Impacto de la exposición crónica al imidacloprid (dosis 1 = 0,001 μ g/abeja), infección por <i>N. ceranae</i> (100.000 esporas/abeja en el día 0) y ambos factores combinados en la microbiota intestinal de la abeja melífera después de siete días: índice de ASVs observados (A) y el índice de Shannon (B).....	60
Figura 26. Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en la microbiota intestinal de las abejas melíferas expuestas a una dosis subletal de imidacloprid (dosis 1=0,001 μ g/abeja), infectadas por <i>N. ceranae</i> y a ambos factores estresantes combinados durante 7 días.....	62
Figura 27. Impacto del imidacloprid con <i>N. ceranae</i> (A) y de <i>N. ceranae</i> (B) sobre la abundancia relativa de ASVs de la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas en comparación con el grupo control, analizadas con DESeq2.....	63
Figura 28. Impacto de la intoxicación por imidacloprid y/o la infección por <i>Nosema ceranae</i> sobre la supervivencia de las abejas melíferas y el Hazard Ratio.....	64

Figura 29. Consumo diario de jarabe por abeja dependiendo del grupo en los primeros 15 días del ensayo.....	66
Tabla 1. Lista seleccionada de funciones asociadas con la microbiota intestinal de las abejas melíferas.....	43
Tabla 2. Lista de cebadores usados en este trabajo	52
Tabla 3. Impacto de la intoxicación con imidacloprid, imidacloprid combinado con <i>N. ceranae</i> , infección por <i>N. ceranae</i> y control (jarabe) sobre la beta diversidad de la microbiota intestinal de las abejas melíferas.....	61
Tabla 4. Mediana del tiempo de supervivencia y los límites inferior y superior del intervalo de confianza del 95% (LCI y LCS) para cada grupo en días.....	65

1. RESUMEN

En los últimos años, ha habido una creciente preocupación por el aumento en el uso de pesticidas en la producción agrícola. Un ejemplo es el neonicotinoide imidacloprid, el cual es utilizado comúnmente para combatir insectos plagas en todo el mundo. Diferentes estudios han demostrado el gran impacto que tienen las dosis subletales de este insecticida en la salud de insectos no objetivo, como la abeja melífera. La abeja *Apis mellifera* es el insecto polinizador por excelencia del que dependen una gran variedad de cultivos. Su importancia radica también en la producción de miel, polen, propóleos, jalea real y cera, entre otros productos de la colmena. En particular, la apicultura en Uruguay es un sector netamente exportador, en dónde más del 85% de la producción de miel es exportada. A nivel nacional se estima que entre un 20-30% de las colmenas de abejas melíferas se pierden anualmente. Entre las causas auto-identificadas por los apicultores se encontraron las enfermedades y los pesticidas. Durante los últimos años en Uruguay ha aumentado la superficie destinada para la agricultura, y con ello las importaciones y el uso de pesticidas como el imidacloprid, generando una amenaza en las regiones donde los cultivos comparten la tierra con la apicultura. En Uruguay las abejas locales son principalmente híbridos de abejas melíferas europeas y de abejas africanizadas provenientes de Brasil, se estima que alrededor del 80% de las abejas del territorio nacional son abejas africanizadas. En este trabajo se buscó investigar los efectos subletales de la exposición crónica al imidacloprid sobre la respuesta inmune de las abejas melíferas africanizadas y su impacto sobre la infección por patógenos, la microbiota intestinal y sobre la supervivencia. Para ello, a nivel de laboratorio y bajo condiciones controladas se trabajó con abejas con/sin exposición al imidacloprid y/o al microsporidio *Nosema ceranae*. Nuestros resultados evidenciaron que el imidacloprid afectó la expresión de genes asociados con la inmunidad de las abejas melíferas generando un estado fisiológico anormal, aumentando la expresión del gen que codifica para la lisozima y disminuyendo la expresión del gen que codifica para la himenoptecina. También alteró la microbiota intestinal, especialmente en abejas infectadas por *N. ceranae*. Estos impactos negativos se vieron reflejados en las altas tasas de mortalidad de las abejas expuestas. Contrariamente a lo esperado, la alteración de genes vinculados a la inmunidad o de la microbiota intestinal no favoreció la infección por *N. ceranae* o por el virus de las alas deformes. Estos resultados ilustran los efectos del imidacloprid en las abejas africanizadas y contribuyen a visualizar el alcance del impacto de los pesticidas en los polinizadores.

2. ABSTRACT

In recent years, there has been growing concern about the increased use of pesticides such as the neonicotinoid imidacloprid, which is commonly used to combat pests worldwide. Different studies have shown the great impact that sublethal doses of this insecticide have on the health of non-target insects such as the honey bee. The honey bee *Apis mellifera* is one of the most important pollinator insect which depend on a wide variety of crops. Its importance also lies in the production of honey, pollen, propolis, royal jelly and wax, among other products of the hive. In particular, beekeeping in Uruguay is a purely export sector, where more than 85% of honey production is exported. At the national level it is estimated that between 20-30% of honey bee colonies are lost annually. Among the causes self-identified by beekeepers were diseases and pesticides. During the last years in Uruguay, the area destined for agriculture has increased, and with it imports and the use of pesticides such as imidacloprid, creating a threat in regions where crops share land with beekeeping. In Uruguay, local bees are mainly hybrids of European honey bees and Africanized honey bees from Brazil, it is estimated that around 80% of our honey bees are Africanized bees. In this work, we investigated the sublethal effects of chronic exposure to imidacloprid on the immune response of Africanized honey bees and its impact on infection by pathogens, the intestinal microbiota and survival. To do this, at the laboratory level and under controlled conditions, we worked with bees with/without exposure to imidacloprid and/or microsporidium *Nosema ceranae*. Our results showed that imidacloprid affected the expression of genes associated with immunity of honey bees, generating an abnormal physiological state, increasing the expression of the gene that codes for *lysozyme* and decreasing the expression of the gene that codes for *hymenoptaecin*. It also altered the gut microbiota, especially in bees infected by *N. ceranae*. These negative impacts were reflected in the high mortality rates of exposed honey bees. Contrary to expected, the alteration of the immune response or gut microbiota did not favor the infection by *N. ceranae* or the infection by the deformed wing virus. These results illustrate the effects of imidacloprid on Africanized honey bees, and contribute to visualize the extent of the impact of pesticides on pollinators.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Características de la abeja melífera

Las abejas son insectos pertenecientes al Reino: Animal, Filo: Artrópodos, Clase: Insecta y al Orden: Hymenoptera (Webster, 2019). Existen alrededor de 25.000 especies de abejas descritas, divididas en 11 familias, numerosas subfamilias, géneros, especies y subespecies. La mayoría de estas abejas son solitarias, viviendo sin organización social (Devillers, 2002). Sin embargo, dentro de la familia Apidae, encontramos abejas sociales pertenecientes a las subfamilias: Meliponinae (abejas sin aguijón), Euglossinae (abejas de las orquídeas), Bombinae (abejorros) y Apinae (abejas melíferas) (Michener, 1990). En esta última subfamilia encontramos una sola tribu llamada Apini, dentro de la cual se halla el género *Apis*. En este género existen cuatro especies principales; *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea* y *Apis mellifera* (Ruttner, 1988) (Fig. 1). Cada una de estas especies presentan una morfología particular, por ejemplo la especie *Apis dorsata* es la de mayor tamaño mientras que *Apis florea* es la más pequeña (Makkar *et al.*, 2020).



Figura 1. Especies de abejas pertenecientes al género *Apis*. (1) *Apis mellifera*, (2) *Apis cerana*, (3) *Apis dorsata*, (4) *Apis florea*. Fuente: Makkar *et al.*, 2020.

La especie *Apis mellifera* es sin duda la más manejada por los apicultores (Li, 2019) y contribuye a la polinización de una gran variedad de cultivos (Williams, 2002; Breeze *et al.*, 2011). Estos insectos son de gran relevancia para la humanidad desde la antigüedad, tanto de forma directa a través de la apicultura como indirectamente a través de la agricultura, por lo que su importancia no es exclusivamente ecológica, sino también económica (Carreck & Williams, 1998). Las colonias de abejas melíferas se encuentran conformadas por tres castas distintas. Cada colonia contiene entre 20.000 a 80.000 abejas obreras estériles (representando el 98% de la población), una sola abeja reina hembra reproductora y machos

llamados zánganos, cuya única tarea es aparearse con las abejas reinas (Li, 2019; Webster, 2019).

Las abejas melíferas son insectos eusociales debido a que viven en colonias donde existen generaciones superpuestas, cuidado cooperativo de la cría y división reproductiva del trabajo donde las abejas obreras ayudan a los miembros reproductivos (abeja reina y zánganos) (Remolina & Hughes, 2008; Canciani *et al.*, 2019). Durante los primeros días de la vida adulta, las abejas obreras son limpiadoras de celdas, luego a los 3 días de edad, son nodrizas y se encargan de alimentar a la cría. También realizan otras tareas como el cuidado de la reina, la protección de la cría, el aseo (*grooming*) y la alimentación de los otros individuos de la colonia. Este patrón continúa durante los próximos 10-12 días de edad. En este punto, dejan el área de cría central para trabajar principalmente en la región periférica de almacenamiento de alimentos de la colmena. Allí ellas funcionan principalmente como almacenadoras de alimentos. Finalmente, aproximadamente a los 20 días de edad hasta el final de la vida, las abejas obreras trabajan fuera de la colmena como recolectoras o forrajeras, recolectando néctar, polen, agua, resina o alguna combinación de estas sustancias (Winston, 1991; Seeley, 2009).

3.1.1. Proceso de Africanización en Uruguay

La abeja melífera no es originaria de América, fue importada desde Europa durante la época colonial en el siglo XVII. Este insecto es nativo de Europa, Asia y África, y evolucionó a diferentes subespecies por geografía en África y Euroasia. Estas abejas melíferas se conocen como abejas melíferas europeas y occidentales (Whitfield *et al.*, 2007).

La abeja africana, *Apis mellifera scutellata*, fue introducida a América del Sur en el año 1956 cuando científicos brasileños importaron reinas de Sudáfrica y Tanzania al estado de São Paulo (Brasil) en un esfuerzo por mejorar el stock genético de abejas (Kerr, 1957; Kent, 1988). Casi de inmediato, las abejas escaparon del cautiverio, se hibridaron con las poblaciones de abejas melíferas existentes y comenzaron a distribuirse por el continente sudamericano. Estas abejas se diseminaron rápidamente, eliminando las poblaciones de abejas existentes mediante agresión, ventaja competitiva en la explotación de recursos, mayor capacidad reproductiva y flujo de genes (Kent, 1988).

En Uruguay las abejas locales son principalmente híbridos generados por abejas melíferas europeas (*Apis mellifera mellifera* traídas al país en el siglo XIX) (Cordara, 2005) y abejas africanizadas provenientes de Brasil (derivadas de *Apis mellifera scutellata*) (Diniz *et al.*, 2003; Collet *et al.*, 2006) (Fig. 2). En el año 2011, se determinó que las abejas africanizadas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el territorio nacional, representando el 80% de las colonias (Branchiccela *et al.*, 2014).



Figura 2. Imagen en donde se observa una abeja africanizada (especimen oscuro) y una abeja europea (especimen más claro) sobre el panal. Fuente: ©Scott Bauer/USDA-ARS.

3.2. Importancia de la abeja *Apis mellifera*

La polinización es un fenómeno esencial para la producción frutícola, hortícola y forrajera, así como para la obtención de semillas para el cultivo de raíces y fibras (McGregor, 1976). Es importante que este suceso ocurra de manera adecuada para poder obtener una mayor producción, y en muchos casos un mejor tamaño, uniformidad, forma y maduración temprana de los frutos (Santos *et al.*, 2009). Un 35% de la producción agrícola a nivel mundial depende de la polinización (Klein *et al.*, 2007). En el año 2005, dicho fenómeno tuvo un valor económico estimado de 153.000 billones de euros, representando el 9,5% del valor de la producción mundial (Gallai *et al.*, 2009). Por lo tanto, la polinización es un servicio ecosistémico crítico para la vida de los seres humanos, así como para la producción de alimentos (Hein, 2009; Breeze *et al.*, 2011; Potts *et al.*, 2016). Este servicio puede ser realizado tanto por vectores abióticos (agua o viento) como bióticos (animales). Entre estos últimos se encuentran las abejas, insectos que por excelencia participan en la polinización, teniendo una gran importancia tanto ecológica como económica en los agroecosistemas (Potts *et al.*, 2016). Adicionalmente, las abejas son los polinizadores más eficientes y confiables, ya que visitan las flores metódicamente para recolectar néctar y polen y no destruyen la flor o la planta en el proceso (Devillers, 2002). La especie de abeja más conocida a nivel mundial es la *Apis mellifera* L. o abeja melífera (Breeze *et al.*, 2011; Pantoja *et al.*, 2014; Potts *et al.*, 2016), la cual juega un papel importante en la economía global ayudando en la polinización de una gran variedad de cultivos (Schmidt, 1997).

En Uruguay, se ha observado que la abeja *Apis mellifera* permite obtener un mejor rendimiento de semillas por hectárea, traduciéndose en mayores ingresos económicos. Existen semilleros de trébol blanco, trébol rojo, lotus y otros, para los cuales en muchos casos se contrata servicio de polinización, para obtener más semillas. Por otra parte, el valor económico estimado de la acción polinizadora de las abejas en nuestro territorio asciende a

1.675.393.134\$, al permitir aumentar en un 70% los ingresos monetarios de la producción de manzana, membrillo, durazno, pera, frutilla, ciruela, girasol, tomate, zapallo kabutiá, zapallitos y otros zapallos (Santos *et al.*, 2009). Además de su imprescindible función polinizadora, las abejas melíferas permiten obtener una gran variedad de productos de la colmena como miel, polen, propóleos, jalea real, cera y veneno (Schmidt, 1997; Lunardi *et al.*, 2017).

3.3. Situación de la Apicultura en Uruguay

En Uruguay la apicultura aparece por primera vez en el año 1834, cuando Bernardino Rivadavia (ex presidente de Argentina), introduce la primera colmena de abejas melíferas en Colonia del Sacramento (Cordara, 2010). Dentro del territorio nacional, el número de apicultores y de colmenas ha ido variando a lo largo de los años. En el periodo 2014-2017 el número de colmenas se mantuvo relativamente constante a diferencia del número de apicultores que se vio disminuido (Fig. 3). Por otra parte, en los últimos dos años hubo una disminución tanto en el número de apicultores como de colmenas en el territorio nacional. En la actualidad, el sector apícola cuenta con 2.489 apicultores inscriptos en el Registro Nacional de Propietarios de Colmenas (RNPC) y 560.983 colmenas a nivel nacional. Los departamentos con mayor cantidad de colmenas son aquellos ubicados en el litoral oeste del país; Soriano (74.441), Colonia (67.292) y Paysandú (66.805) (MGAP, 2020a).

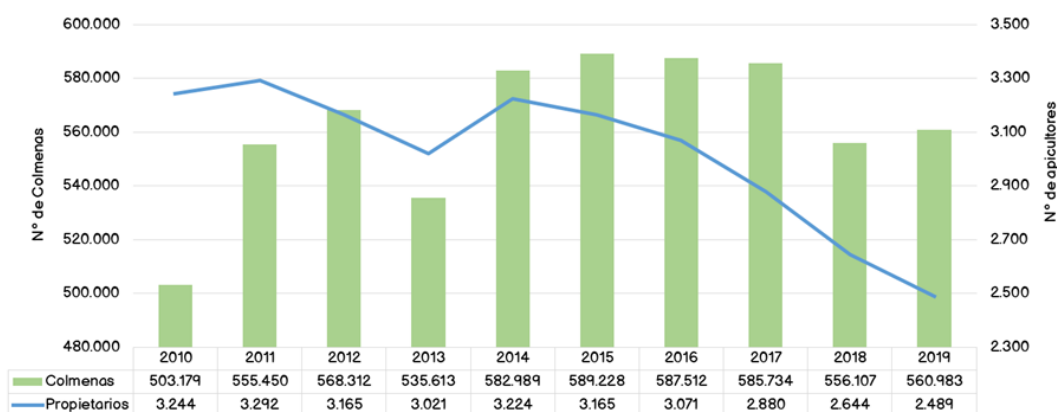


Figura 3. Número de colmenas y de apicultores en Uruguay (2010-2019). Fuente: MGAP, 2020a.

Por su parte, la producción de miel se ha visto afectada conforme el paso de los años. En el periodo 2011-2015 se mantuvo un nivel de producción anual en el entorno de las 12.000 toneladas. Sin embargo, en los últimos dos años dicha producción alcanzó valores en el entorno de las 9.000 toneladas, coincidiendo con la disminución de apicultores y colmenas a nivel nacional (Fig. 4) (MGAP, 2020a).

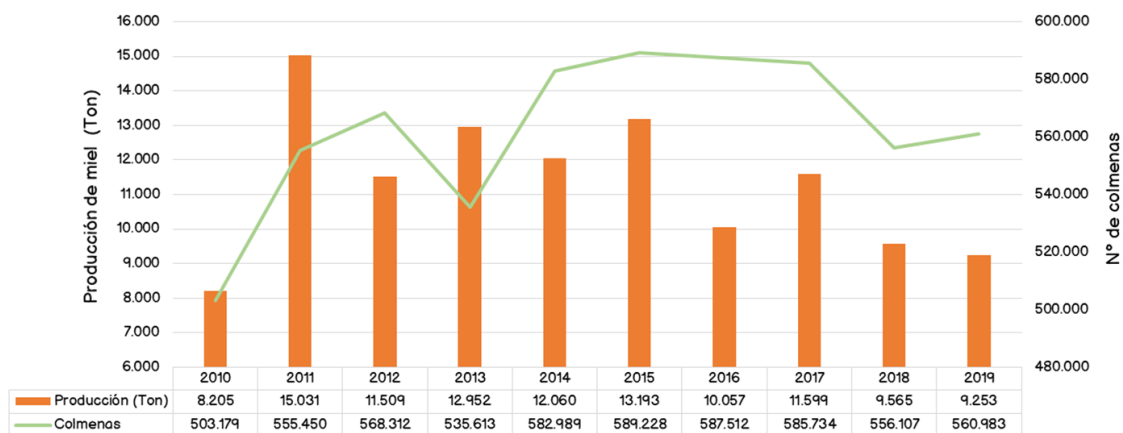


Figura 4. Producción de miel y número de colmenas en Uruguay (2010-2019). Fuente: MGAP, 2020a.

Se trata de un sector netamente exportador, ya que el 85% de la miel producida es exportada. Las exportaciones nacionales de miel presentaron un récord de exportación en 2011, año en el que se superaron los 42 millones de dólares (15 mil toneladas) (CHDA, 2018). Los años subsiguientes, hasta 2015, el promedio exportado fue en el entorno de los 38 millones de dólares (11.800 toneladas anuales) (Fig. 5). Sin embargo, en el año 2019 las exportaciones de miel presentaron una drástica caída, alcanzando los casi 17 millones de dólares, evidenciando las dificultades que enfrenta el sector. En los últimos 8 años, Uruguay exportó miel principalmente a España, Estados Unidos, Alemania y Polonia (MGAP, 2020a).

Año	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Volumen (toneladas)	11.654	12.701	10.887	12.100	7.736	9.549	5.803	8.148
España	194	571	1.187	1.010	1.704	1.643	2.132	3.440
Estados Unidos	612	8.958	5.210	7.328	2.314	4.184	1.383	1.685
Alemania	10.697	2.599	3.240	2.773	1.827	2.074	797	835
Polonia	-	-	-	-	-	-	331	432
Otros ⁽¹⁾	152	572	1.250	989	1.891	1.648	1.159	1.757
Valor (miles de dólares) ⁽²⁾	31.281	40.144	39.120	40.619	16.907	26.469	14.148	16.839

⁽¹⁾. Austria, Bélgica, Rep Checa, Dinamarca, Francia, Israel, Italia, Eslovaquia, Eslovenia, África del Sur, Suiza, Emiratos Arabes Unidos y Reino Unido

⁽²⁾ Calculado en base a volúmenes de DILAVE y precios promedio de BCU.

Figura 5. Exportación de miel en volumen y valor según país de destino. Período 2012 – 2019. Fuente: MGAP, 2020a.

Otros productos apícolas exportados en los últimos años fueron el propóleo y la cera de las abejas (Fig. 6). Dichas producciones tienen valores significativamente más bajos respecto a las exportaciones de miel. En el año 2020 las exportaciones de propóleo disminuyeron a 1.193,07 kg, teniendo su pico en el 2018 con un valor estimado de 27.943,95 kg. Por su parte la exportación de cera fue muy fluctuante en los últimos 14 años, habiendo años en donde no hubo exportaciones y otros en donde se llegó a exportar 15.030 kg (MGAP, 2020b).

Año	Miel	Propóleo	Cera	Polen
2006	12.548.914,05	16.848,80	0,00	0,00
2007	13.841.753,80	7.654,45	0,00	0,00
2008	9.532.735,70	15.397,25	21.230,00	0,00
2009	6.252.603,70	10.246,27	540,00	0,00
2010	8.294.244,60	14.057,83	0,00	0,00
2011	14.075.087,10	11.845,40	0,00	0,00
2012	11.335.931,00	13.445,26	0,00	0,00
2013	12.531.455,80	13.638,04	0,35	0,00
2014	10.796.804,53	10.137,00	1.525,85	0,00
2015	12.131.437,36	17.993,30	1.950,80	0,00
2016	7.758.532,00	12.483,40	15.030,00	0,00
2017	9.465.700,40	14.200,60	6,00	0,00
2018	5.697.311,55	27.943,95	2.380,00	0,00
2019	8.147.246,95	13.355,83	0,00	0,00
2020	14.179.486,46	1.193,07	1.100,00	0,00

Figura 6. Exportaciones de productos apícolas por año (en kg). Fuente: MGAP, 2020b.

Por otra parte, en la última década, hubo un aumento de la superficie destinada a la agricultura, pasando de 673 mil a 1.6 millones de hectáreas. Esto se debió a que el área destinada para cultivos cerealeros (excluyendo al arroz) e industriales de secano tuvo un aumento de 942 mil hectáreas, siendo esencialmente a causa del cultivo de la soja, cuya área pasó de 17 mil a 930 mil hectáreas. Esto llevó a que la agricultura extensiva de secano (cerealeras y oleaginosas) tenga una presencia generalizada dentro de lo agropecuario, teniendo una fuerte localización en el litoral oeste del país (MGAP, 2015). Como consecuencia, las importaciones de pesticidas aumentaron significativamente en los últimos años en el territorio nacional, haciendo que más de 1.100 productos químicos estén registrados para uso agrícola (MGAP, 2019). Este hecho ha afectado al sector apícola ya que se han encontrado en distintas matrices de la colmena (abejas, miel, polen y cera) residuos de distintos pesticidas utilizados a nivel de campo siendo una situación alarmante, no solo para los apicultores, sino también para los agricultores y todos los productores que dependen de la polinización para tener éxito en sus actividades agrícolas (Niell *et al.*, 2015).

3.4. Pérdida de colonias de abejas melíferas

En los últimos años se han reportado numerosas pérdidas de colonias de abejas melíferas alrededor del mundo (Kulhanek *et al.*, 2017; Requier *et al.*, 2018; Gray *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020). En particular, esta situación alarmante derivó en la necesidad de reunir esfuerzos para adaptar, centralizar y estandarizar los métodos de monitoreo de la salud de las abejas melíferas y las pérdidas de colonias en todos los países de América Latina. En la actualidad, este hecho constituye el principal objetivo del grupo de trabajo "Pérdida de colonias" de la Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas, SOLATINA, una plataforma a gran escala creada

en 2017 para coordinar los programas de investigación apícola en América Latina (Requier *et al.*, 2018).

Existe evidencia que tanto la agricultura como la apicultura a nivel industrial exponen a las abejas melíferas a múltiples factores estresantes que interactúan y conducen a la pérdida de colonias (Fig. 7) (Colwell *et al.*, 2017; Alger *et al.*, 2018).

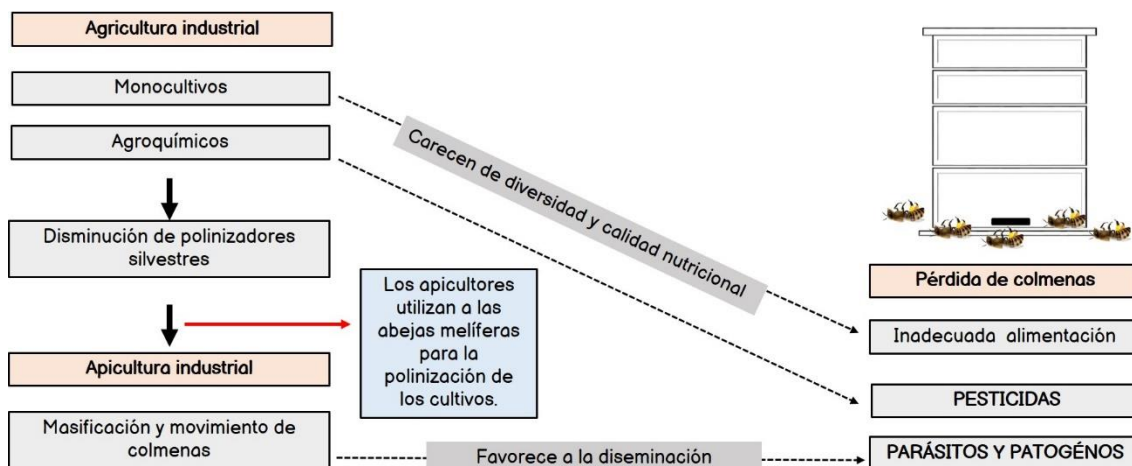


Figura 7. Representación esquemática de los múltiples factores estresantes que interactúan y que tienen un impacto negativo sobre la salud de las abejas melíferas. Fuente: Adaptado de Shanahan, 2022.

En particular, la prevalencia de los paisajes de monocultivos, los cuales se caracterizan por carecer de diversidad y calidad nutricional, contribuyen a que las abejas melíferas reciban una inadecuada alimentación (Fig. 7) (Decourtye *et al.*, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2016). Adicionalmente, el uso intensivo de agroquímicos ha ocasionado que las abejas melíferas se vean expuestas a los pesticidas diariamente (Shanahan, 2022). Incluso los parásitos y patógenos, factores estresantes que parecen estar separados de la agricultura industrial, se ven exacerbados por este sistema (Welch *et al.*, 2009; Alger *et al.*, 2018). De hecho, cuando las abejas melíferas se alojan en colmenas con alta densidad poblacional, el potencial de transmisión de patógenos aumenta y crea condiciones que favorecen una mayor virulencia (Brosi *et al.*, 2017). Además, las prácticas migratorias, la venta a través del país de colmenas de abejas melíferas, y la creciente popularidad de la apicultura aficionada, favorecen a la disseminación de los parásitos y patógenos entre colmenas (Brosi *et al.*, 2017; Dynes *et al.*, 2019). Por otra parte, este modelo agroindustrial ha ocasionado la disminución de polinizadores silvestres haciendo que los apicultores tengan que aumentar el número de colmenas de abejas melíferas para de esta forma poder brindar el servicio de polinización de cultivos. Esto ha llevado a la masificación (aumento de colmenas distribuidas en la misma superficie) y al movimiento de colmenas, lo que favorece la disseminación de parásitos y patógenos a nivel colonial (Shanahan, 2022).

En Uruguay se estima que entre un 20-30% de colmenas de abejas melíferas se pierden anualmente (Antúnez *et al.*, 2017; Requier *et al.*, 2018). Dichas pérdidas pueden deberse a diversos factores tales como parásitos y patógenos (*Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, diferentes tipos de virus ARN, entre otros) y agentes químicos (particularmente los pesticidas) (Le Conte & Navajas, 2008; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Goulson *et al.*, 2015; Steinhauer *et al.*, 2018; Neov *et al.*, 2019).

3.5. Principales patógenos de interés apícola

La rápida propagación de plagas y patógenos así como el aumento en la resistencia a las moléculas empleadas para su control son factores claves en la disminución de las poblaciones de abejas melíferas (Belsky & Joshi, 2019). A continuación, se describen los principales patógenos que afectan a las abejas melíferas: el ácaro *Varroa destructor*, distintos virus ARN y microsporidios pertenecientes al género *Nosema* spp.

3.5.1. *Varroa destructor*

El ácaro *Varroa destructor*, anteriormente conocido como *Varroa jacobsoni* (Anderson *et al.*, 2000), fue reportado por primera vez en el sudeste asiático y posteriormente se extendió rápidamente por toda Europa, América, África y la región Asia-Pacífico (Matheson, 1995; Oldroyd, 1999). Desde su migración de la abeja melífera asiática (*Apis cerana*) a la abeja melífera europea (*Apis mellifera*), este ectoparásito se ha convertido en el principal problema para la apicultura en todo el mundo (Noël *et al.*, 2020; Traynor *et al.*, 2020). En la actualidad se encuentra distribuido en casi todos los continentes; sólo algunos países se encuentran libres de este ácaro como el Congo, República democrática del Congo y Malawi pertenecientes al continente Africano; Omán del continente Asiático y finalmente Australia, Fiji y Nueva Caledonia del continente Oceánico (Fig. 8) (Boncristiani *et al.*, 2020).

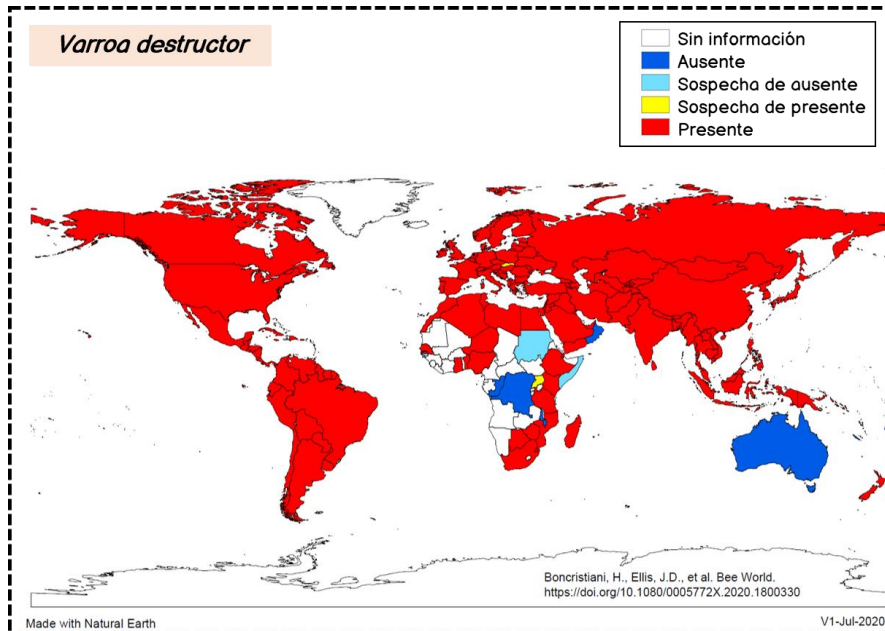


Figura 8. Distribución mundial del ácaro *Varroa destructor*. Fuente: Boncristiani *et al*, 2020. Adaptado de: <http://worldhoneybeehealth.com/pathogens-and-pests/>.

3.5.1.1. Impacto del ácaro sobre la salud de las abejas melíferas

En las abejas adultas, el ácaro disminuye el peso corporal y la longevidad (Weinberg & Madel, 1985; Yang & CoxFoster, 2007; Annoscia *et al*, 2012; Aronstein *et al*, 2012). Esto se debe a que *Varroa destructor* se alimenta principalmente del tejido adiposo y en menor medida de la hemolinfa tanto de abejas adultas como de larvas (Ramsey *et al*, 2019). Por otra parte, se ha visto que altera las habilidades de vuelo, búsqueda y la orientación de las abejas (Kralj & Fuchs, 2006), lo que limita la eficiencia en su capacidad para recolectar los recursos necesarios para el desarrollo de la colonia. A su vez, este ácaro afecta la respuesta inmune de las abejas ya que provoca una disminución en la expresión de genes relacionados con la inmunidad (Marche *et al*, 2019). Además, existen evidencias que la respuesta inmune frente a la infestación por el ácaro difiere entre sexos ya que es significativamente mayor la prevalencia y la gravedad de la varroosis en los zánganos. Estos hallazgos se atribuyen a que los zánganos tienen una mayor masa corporal y un desarrollo más largo dentro de las celdas, lo que favorece la reproducción del ácaro (Zaobidna *et al*, 2017). Por otra parte, *Varroa destructor* al disminuir el tamaño de los zánganos induce a un déficit en la producción de espermatozoides y, por tanto, en su capacidad reproductiva (Duay *et al*, 2002). Por último, este ectoparásito es capaz de transmitir distintos virus ARN a las abejas (Ball & Allen, 1988; Martin, 2001; Chen *et al*, 2004; Tentcheva *et al*, 2004; Shen *et al*, 2005; Di Prisco *et al*, 2011; Martin *et al*, 2012).

3.5.1.2. Ciclo de vida del ácaro

El ácaro *V. destructor* tiene un ciclo de vida dividido en dos fases; una fase reproductiva en donde se reproduce dentro de las celdas de las abejas afectando a las larvas y una fase forética en donde afecta a las abejas adultas (Fig. 9) (Rosenkranz *et al.*, 2010; Nazzi & Le Conte, 2016). La fase reproductiva comienza con la invasión de la celda de la cría, la cual contiene el estadio larvario de la abeja, unas horas antes de que la misma sea sellada. Dentro de esta celda, el ácaro hembra normalmente pone huevos que producen primero un macho y luego algunas hembras. Las crías se aparean entre sí de modo que cuando la abeja adulta emerge, tanto la hembra invasora como la cría de ácaros hembra madura fertilizada abandonan la celda. Luego se transfieren a una abeja adulta, donde pasan a la fase forética, antes de ingresar a una celda de cría para reproducirse nuevamente. Los ácaros machos no pueden sobrevivir fuera de la celda y mueren. Por su parte, los ácaros hembras pueden pasar por dos o tres ciclos a lo largo de su vida (Nazzi & Le Conte, 2016).

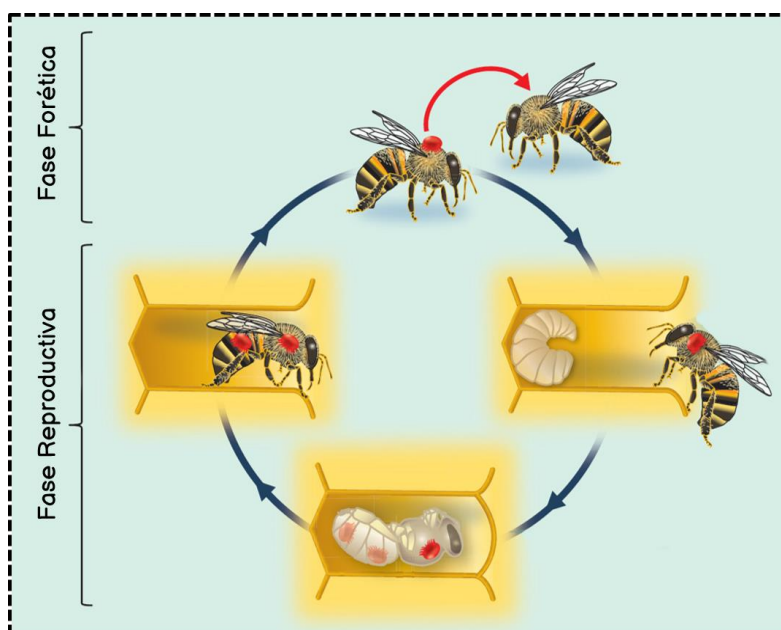


Figura 9. Ciclo de vida del ácaro *Varroa destructor*. Fuente: Adaptado de Nazzi & Le Conte, 2016.

3.5.1.3. Situación del ácaro en Uruguay

En Uruguay, *Varroa destructor* fue detectado por primera vez en el año 1978 en el departamento de Montevideo (Invernizzi *et al.*, 2011). Este ácaro se encuentra ampliamente distribuido por todo el territorio nacional, mostrando una prevalencia del 75,7% en otoño (Anido *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha visto que el ciclo de vida de *V. destructor* está vinculado con el ciclo de las abejas, aumentando su intensidad de infestación durante el verano hasta el otoño, cuando una gran cantidad de crías está disponible para la reproducción (Antúnez *et al.*, 2015).

La mayoría de las colonias del país necesitan tratamiento con productos acaricidas para sobrevivir. Un escenario diferente ocurre en las poblaciones de abejas del departamento de Treinta y Tres, en el este del país, donde las colonias pueden sobrevivir sin tratamientos. Esto podría deberse a que esas poblaciones presentan un mayor comportamiento higiénico y de grooming (acicalamiento) (Mendoza *et al.*, 2020).

3.5.2 Virus

Los virus son patógenos intracelulares, oportunistas y obligados que requieren la maquinaria celular del huésped para la transcripción, traducción y replicación (Chen & Siede, 2007). Estos agentes fueron identificados por primera vez como una nueva clase de patógenos que infectan a las abejas melíferas, a partir del trabajo publicado por el científico estadounidense G. F. White en el año 1913 (White, 1913). Desde entonces, se ha informado que al menos 70 virus infectan a la abeja melífera en todo el mundo (Allen & Ball, 1996; Ellis & Munn, 2005; Beaurepaire *et al.*, 2020). Aunque el conocimiento sobre los virus de las abejas melíferas sigue siendo limitado en comparación con el de otros virus de insectos, la comprensión de las infecciones virales en las abejas melíferas ha ido aumentando considerablemente en las últimas tres décadas. Se ha acumulado información sobre sus propiedades fisicoquímicas, historia natural, transmisión, incidencia y su patología (Chen & Siede, 2007; Yañez *et al.*, 2020). El aumento de la accesibilidad a las técnicas de secuenciación de próxima generación y análisis bioinformáticos ha generado un salto en el conocimiento en este campo. En el pasado, aislar, identificar y evaluar la prevalencia y distribución de nuevos virus era un proceso laborioso que involucraba microscopía electrónica y detección mediada por anticuerpos (Bailey, 1976; Bailey, 1991; Chen & Side, 2007). Por lo tanto, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento han invertido de manera efectiva todo este paradigma al descubrir, mediante secuenciación y análisis bioinformáticos, una asombrosa diversidad de virus previamente desconocidos que supera ampliamente a los virus conocidos causantes de enfermedades (Shi *et al.*, 2016). Estos descubrimientos han demostrado que la inmensa mayoría de los virus generan infecciones asintomáticas y que sólo una pequeña proporción ocasiona alguna enfermedad (Roossinck, 2015). En la actualidad se estima que existen más de 70 virus que afectan a las abejas melíferas, siendo en su mayoría virus ARN (Beaurepaire *et al.*, 2020).

3.5.2.1. Virus de relevancia apícola

Entre los principales virus que afectan a la abeja *Apis mellifera* encontramos: el virus de la parálisis aguda (ABPV), virus de la parálisis crónica (CBPV), virus de la cría ensacada (SBV), virus de la celda negra (BQCV) y el virus de las alas deformes (DWV) (Antúnez *et al.*, 2006; Chen & Siede, 2007). En las abejas afectadas por el virus ABPV se observan movimientos débiles y temblorosos y posteriormente su muerte (Bailey & Gibbs, 1964). Por su parte, el virus

CBPV se caracteriza por ocasionar temblor anormal del cuerpo y de las alas de las abejas, gateo por el suelo debido a la incapacidad de vuelo, abdómenes hinchados y alas dislocadas. La otra forma se identifica por la presencia de abejas sin pelo, brillantes y de apariencia negra que son atacadas y rechazadas cuando regresan a las colonias a la entrada de las colmenas por las abejas guardianas. Ambas formas de síntomas se pueden observar en abejas de la misma colonia. La variación en los síntomas de la enfermedad puede reflejar diferencias entre abejas individuales en cuanto a la susceptibilidad heredada a la multiplicación del virus (Kulinčević & Rothenbuhler, 1975; Rinderer, 1975). En el caso del virus SBV, se observan síntomas específicos y distintivos, larvas llenas de líquido con cambios de coloración de blanco perlado hasta alcanzar un color amarronado oscuro comenzando por las regiones de la cabeza y del tórax (Bailey & Ball, 1991). En cuanto al virus BQCV, afecta a larvas de reina, cambiándoles su coloración y a las pupas las cuales se vuelven oscuras y mueren rápidamente. Otra particularidad de esta enfermedad es que las celdas de la colmena se vuelven oscuras y las abejas obreras afectadas no suelen manifestar síntomas (Chen & Siede, 2007). Finalmente, el virus DWV tiene como síntomas típicos las alas arrugadas y encogidas, disminución del tamaño corporal y decoloración en las abejas adultas si se les asocia el ácaro *Varroa destructor* (De Miranda & Genersch, 2010). Esto hace que las abejas no sean viables y mueran (Yang & Coxfooster, 2007).

3.5.2.2. Situación de los virus en Uruguay y países vecinos

En Uruguay, los primeros virus detectados fueron el ABPV y CBPV en el año 2005 (Antúnez *et al.*, 2005). Posteriormente, se detectaron los virus BQCV, SBV y DWV (Antúnez *et al.*, 2006). En el año 2011, en un estudio realizado a nivel nacional, se detectó una alta prevalencia del virus BQCV (87,4% \pm 6,4%) y una amplia distribución en todo el país. Por otra parte, los virus DWV, ABPV y SBV presentaron una prevalencia de moderada a baja (DWV 29,1% \pm 8,8%, SBV 19,4% \pm 7,6%, ABPV 14,6% \pm 6,8%) y su distribución fue más restringida a las regiones oeste y suroeste del país (principales regiones apícolas) (Anido *et al.*, 2015).

A nivel regional, Brasil ha reportado la presencia de tres de estos seis virus: ABPV, BQCV y DWV (Teixeira *et al.*, 2008; Peixoto *et al.*, 2020). En Argentina se han detectado: DWV, ABPV, BQCV, CBPV y el virus SBV (Molineri *et al.*, 2017; Salina *et al.*, 2021). Por su parte en Chile también se han reportado los virus ABPV, BQCV, CBPV y DWV (Rodríguez *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2017).

3.5.2.3. Virus de las alas deformes (DWV)

El DWV se ha convertido en el virus más conocido, extendido y estudiado en todo el mundo debido a su posible asociación con la pérdida de colonias (Schroeder & Martin, 2012; Martin & Brettell, 2019). Existe evidencia que el DWV en ausencia del ácaro *Varroa destructor* también

ha estado implicado en la muerte de colonias. Esto sugiere que este patógeno está evolucionando a diferentes velocidades, lo que da como resultado niveles variables de virulencia que no dependen del ciclo de transmisión *Varroa*-abeja (Highfield *et al.*, 2009; Genersch *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2012). En la actualidad, el DWV es el virus más prevalente en 32 países, con un promedio mínimo del 55% de las colonias /apiarios infectados (Martin & Brettell, 2019). Como se observa en la figura 10, el DWV se encuentra distribuido en casi todos los continentes; siendo Sudán el único país en donde no se ha detectado aún. Por otra parte, existe la sospecha de la presencia de este virus en Madagascar (Boncristiani *et al.*, 2020).

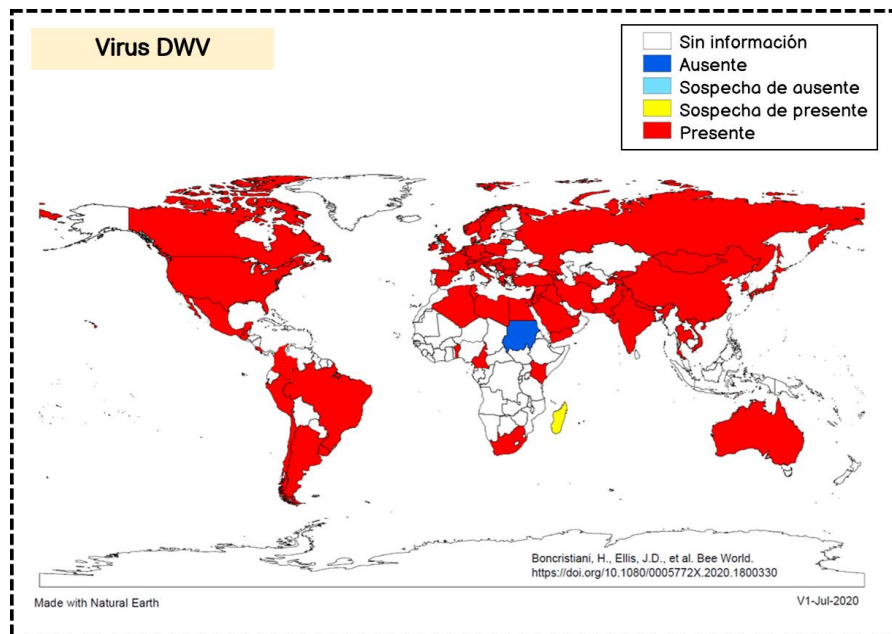


Figura 10. Distribución mundial del virus DWV. Fuente: Boncristiani *et al.*, 2020. Adaptado de <http://worldhoneybeehealth.com/pathogens-and-pests/>.

3.5.2.4. Ciclo infeccioso del virus DWV

La transmisión del virus DWV, al igual que en todos los virus que afectan a la abeja melífera, ocurre en forma horizontal y vertical (Yañez *et al.*, 2020) (Fig. 11). En la transmisión horizontal, el virus se transfiere entre individuos de la misma generación, mientras que en la transmisión vertical se produce de la abeja reina a su descendencia. Debido a su estructura social altamente organizada y su densidad poblacional, la colmena de abejas representa un entorno de riesgo para la propagación de virus (Chen *et al.*, 2006). Entre las vías de transmisión horizontal encontramos la alimentaria, fecal-oral, venérea, y por vectores (indirecta) (Chen & Side, 2007).

La vía alimentaria se produce cuando las abejas consumen alimento contaminado con el virus, esto se ve favorecido cuando existe una alta densidad poblacional, trofalaxis (proceso en el cual las abejas a través del contacto directo se transferieren alimentos, líquidos o secreciones) (LeBoeuf, 2017) y a las altas tasas de contacto físico en la colonia (Chen *et al.*, 2006). Por su

parte, la vía fecal-oral permite la propagación del virus cuando abejas infectadas lo transfieren con sus heces y son ingeridas por abejas no infectadas. Las colonias de abejas melíferas con poblaciones densamente pobladas son una condición favorable para esta ruta de transmisión (Chen & Side, 2007). Por otro lado, la vía venérea está dada cuando en el proceso de fecundación el semen infectado de los zánganos llega a los ovarios y espermateca de la reina. Esto lleva a que posteriormente la reina lo transmita a su progenie (transmisión vertical) (De Miranda & Fries, 2008). Finalmente, la vía indirecta está dada principalmente por el ácaro *Varroa destructor*, el cual actúa como vector del DWV. Dicho virus es transmitido por este ácaro a pupas parasitadas y durante su fase forética a abejas adultas. Los ácaros a su vez adquieren DWV cuando se alimentan de pupas infectadas y de abejas adultas (Genersch & Aubert, 2010). Otro aspecto a destacar es que el DWV contamina los productos obtenidos de las abejas como la cera, jalea real, el polen y la miel almacenada dentro de la colmena infectada (Mazzei *et al*, 2014; Schittny *et al*, 2020). A su vez, las abejas infectadas pueden depositar virus en las flores mientras se alimentan, y estos virus pueden infectar a otras abejas que visitan esas mismas flores (McArt *et al*, 2014).

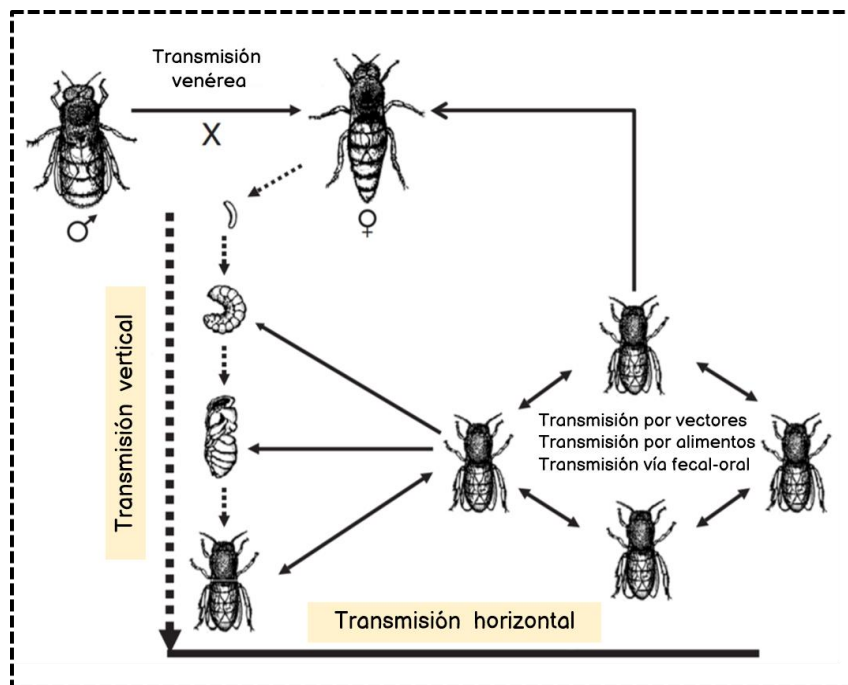


Figura 11. Representación esquemática de rutas de transmisión de virus en abejas melíferas. Fuente: Adaptado de Chen & Side, 2007.

3.5.3 *Nosema* spp.

Los microsporidios son organismos eucariotas unicelulares, parásitos intracelulares obligados, formadores de esporas. Se caracterizan por infectar tanto vertebrados como invertebrados (Weiss & Becnel, 2014). Son económica y médicamente importantes y se pueden encontrar ambientalmente en ecosistemas terrestres, marinos y de agua dulce. El filo Microsporidia consta de más de 200 géneros y aproximadamente 1.300 especies que producen infecciones benignas a letales (Cali *et al.*, 2017).

La nosemosis es una de las enfermedades más extendidas en las abejas melíferas con efectos potencialmente graves en la apicultura (Manzoor *et al.*, 2013). En la actualidad existen tres especies de microsporidios que pueden infectar a la abeja *Apis mellifera*: *Nosema ceranae*, la más prevalente y de distribución mundial (Higes *et al.*, 2013; Fries, 2010), *Nosema apis*, la cual prevalece sobre *N. ceranae* únicamente en climas fríos (Gisder *et al.*, 2010), y *Nosema neumannii*, una especie endémica descrita en Uganda (Chemurot *et al.*, 2017).

Durante décadas, la nosemosis se atribuyó exclusivamente a una sola especie, *Nosema apis*, la cual fue descrita por primera vez en la abeja *Apis mellifera* (Zander, 1909). Luego en el año 1996 fue descubierta otra especie de microsporidio en la abeja asiática *Apis cerana* denominada *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 1996). En 2005, esta especie de microsporidio fue detectado casi simultáneamente en abejas melíferas en Europa (España) y Asia (Taiwan) (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Posteriormente hubo reportes en Estados Unidos (Chen *et al.*, 2008), México (Guzman-Novoa *et al.*, 2011), China (Wang *et al.*, 2019), Australia (Giersch *et al.*, 2009), África (Higes *et al.*, 2009) y América del Sur (Invernizzi *et al.*, 2009; Medici *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2013). Finalmente, el microsporidio *Nosema neumannii* fue recientemente reportado en abejas *Apis mellifera* en Uganda (Chemurot *et al.*, 2017).

3.5.3.1. Sintomatología y características de la Nosemosis en abejas melíferas

El microsporidio *Nosema apis* ocasiona trastornos digestivos y de absorción en las abejas melíferas. Esto se debe a que las esporas dañan las células epiteliales del tubo digestivo, el cual es responsable de la absorción de los alimentos. Las abejas infectadas excretan grandes cantidades de heces acuosas, las cuales contienen una gran cantidad de esporas y son la principal fuente de infección (Michalczyk & Sokół, 2014). Esta enfermedad se caracteriza por abejas con el abdomen distendido con materia fecal. Además, el intestino medio (Midgut) está inflamado y, si se disecciona, muestra un contenido blanco grisáceo opaco. Las abejas ensucian la entrada de la colmena y comienzan a buscar alimento a una edad más temprana presentando una menor capacidad de vuelo (Yadav & Kaushik, 2017).

Por su parte, *Nosema ceranae* ocasiona una reducción significativa en la esperanza de vida de las abejas y dependiendo de la gravedad de la infestación puede causar debilitamiento, colapso de la colmena o incluso ser asintomática (Higes *et al.*, 2010; Vidal-Naquet, 2012). Además, este microsporidio es capaz de suprimir la respuesta inmunitaria de las abejas (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012). En cuanto a *Nosema neumannii*, hasta el momento no se han podido asociar síntomas específicos (Chemurot *et al.*, 2017).

Existen claras diferencias morfológicas entre las esporas de las diferentes especies de microsporidios. Las esporas de *N. neumannii* son las más pequeñas, midiendo 2,22-2,5 μm de largo y 1,72-1,84 μm de ancho (Chemurot *et al.*, 2017), seguida por las esporas de *N. ceranae* con una dimensión de 3,3-5,5 x 2,3-3,0 μm , y por último las esporas de *N. apis* midiendo 4-6 x 2-4 μm (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2010; Ptaszyńska *et al.*, 2014). Otra diferencia morfológica que puede contribuir a la discriminación entre estas tres especies es el número de vueltas del filamento polar, estructura esencial para la invasión celular (Burges *et al.*, 1974). El número de vueltas de este órgano es de entre 10 y 12 para *N. neumannii* (Chemurot *et al.*, 2017), entre 20 y 23 para *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996), y más de 30 vueltas para *N. apis* (Liu, 1984).

3.5.3.2. *Nosema ceranae*

Este microsporidio se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los continentes (Fig. 12). En el continente Americano ha sido reportado en numerosos países como Chile, Uruguay, Brasil, Argentina, Venezuela, México, Estados Unidos y Canadá. Además, se encuentra presente en países de Europa como Italia, España y Francia, entre otros. A nivel del continente Africano se ha observado en países como Argelia, Marruecos, Túnez, Egipto y Kenia. Por su parte, a nivel del continente Asiático se ha observado en países como China, Mongolia, Corea del sur y Japón. Finalmente en Oceanía se ha encontrado en países como Australia y Nueva Zelanda. En la actualidad existen países en donde no se cuenta con la información de si está presente o no *N. ceranae* dentro de su territorio y se sospecha de la presencia de este microsporidio en Colombia (Boncristiani *et al.*, 2020). La evidencia apunta a que *Nosema ceranae* es más prevalente y produce mayores cargas de esporas que *Nosema apis* en algunas regiones del mundo (Paxton *et al.*, 2007; Emsen *et al.*, 2016).

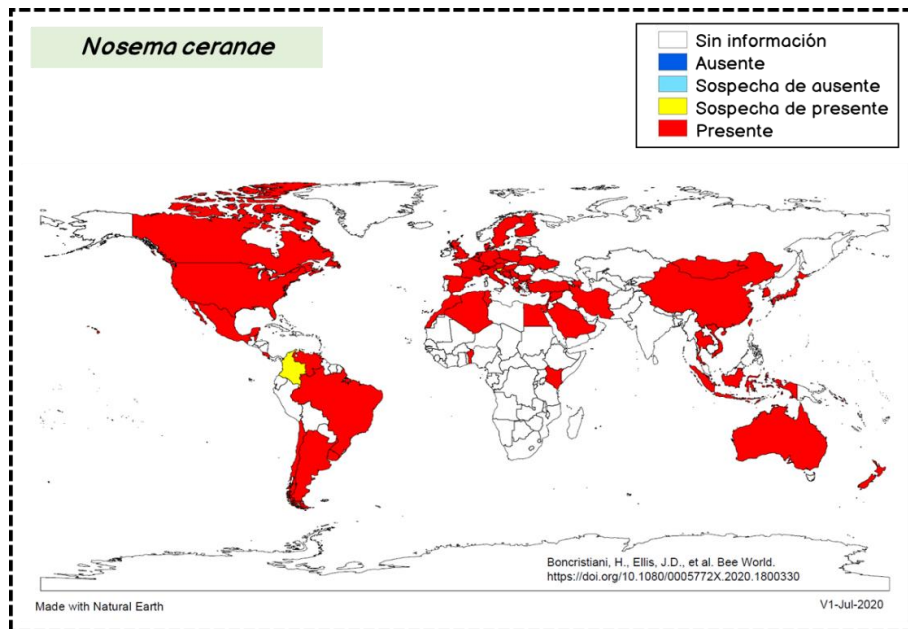


Figura 12. Distribución mundial del microsporidio *Nosema ceranae*. Fuente: Boncristiani *et al*, 2020. Adaptado de <http://worldhoneybeehealth.com/pathogens-and-pests/>.

3.5.3.3. Ciclo infectivo de *Nosema ceranae*

Los microsporidios son patógenos intracelulares obligados por lo que no pueden crecer ni dividirse fuera de la célula huésped (Gisder *et al*, 2011). El ciclo de vida de *N. ceranae*, al igual que para cualquier microsporidio, se puede dividir en tres etapas separadas; una etapa reproductiva vegetativa (Merogonia), una etapa de producción de esporas (Esporogonia) y una etapa infecciosa (espora madura) (Fig. 13) (Vávra & Larsson, 2014; Chen & Evans, 2021).

Las abejas melíferas se infectan cuando ingieren alimentos, agua contaminados con esporas o limpian los cuadros contaminados con esporas (Martín-Hernández *et al*, 2018; Chen & Evans, 2021). Una vez ingerida, la espora infecta la célula huésped e inyecta a través del tubo polar el contenido de esporas infecciosas, esporoplasma, en una célula epitelial del intestino medio (Fries *et al*, 1992; Chen & Evans, 2021). La espora ya vacía y el tubo polar son degradados, mientras que el esporoplasma dentro del citoplasma de la célula huésped sufre múltiples divisiones para producir merontes proliferativos, lo cuales experimentan división binaria y se diferencian en esporontes (Merogonia). Cada esporonte se divide en dos esporoblastos que maduran en esporas mediante la formación de una pared gruesa alrededor de la espora (Esporogonia). Las esporas maduras germinan e infectan las células adyacentes o son liberadas a la luz del intestino medio a través de la lisis celular y se excretan en las heces hacia el entorno de la colmena (Han & Weiss, 2017; Chen & Evans, 2021).

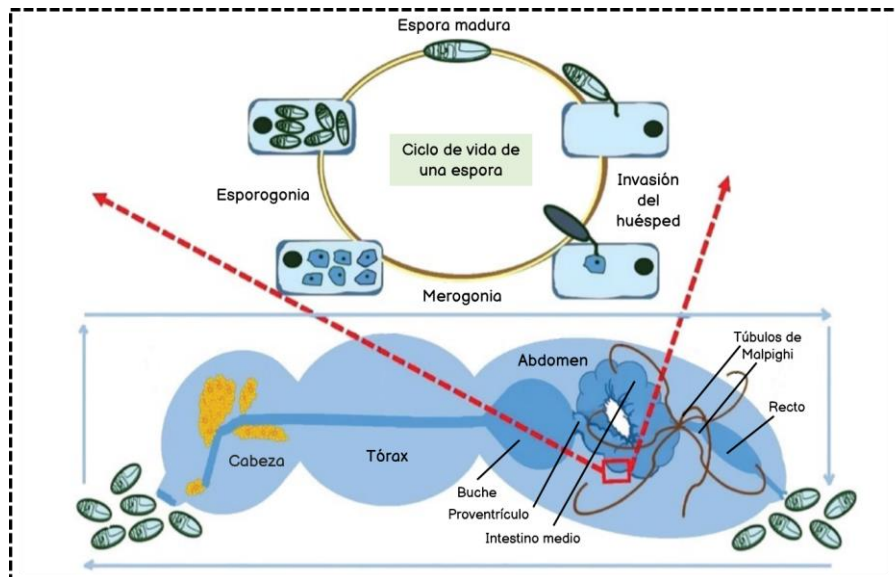


Figura 13. Ciclo de vida de *Nosema ceranae*. La infección comienza cuando una abeja ingiere alimentos / agua contaminados con esporas. Dentro del intestino medio, la espora germina e inyecta su contenido infeccioso en una célula epitelial intestinal a través de un filamento polar o un túbulo polar. Después de una fase vegetativa proliferativa, las esporas maduras se forman y se liberan en el intestino y se eliminan del cuerpo en las heces. Fuente: Adaptado de Chen & Evans, 2021.

3.5.3.4. Situación del microsporidio *Nosema ceranae* en Uruguay

El microsporidio *Nosema ceranae* se encuentra presente en Uruguay desde al menos 1980 (Invernizzi *et al*, 2009). En el último relevamiento realizado a nivel nacional, *Nosema ceranae* fue el único microsporidio detectado con una prevalencia del 14,6% \pm 6,8% (Anido *at al*, 2015). Por otra parte, el trabajo realizado por Mendoza y colaboradores (2014) sugirió que existen diferentes grados de infección por *N. ceranae* entre las razas de abejas italianas y africanizadas ya que estas últimas tienen la capacidad de limitar el nivel de infección dentro de la colmena. Además, se ha observado que las abejas obreras africanizadas presentan una esperanza de vida más corta con respecto a las abejas italianas ya que comienzan a salir en busca de su alimento en etapas más tempranas (Winston & Katz, 1981; Winston & Katz, 1982). Por consiguiente, las abejas africanizadas son más jóvenes y por esa razón se infectarían con una menor cantidad de esporas. A nivel colonial, esto resultaría en una mayor cantidad de esporas de *N. ceranae* circulando en las colonias italianas que en las colonias africanizadas (Mendoza *et al*, 2014).

3.6. Pesticidas y su impacto sobre las abejas melíferas

Los pesticidas pueden definirse como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas. Estas plagas pueden ser insectos, roedores, malezas y otros organismos no deseados (Ecobichon, 2001). En las últimas décadas, su uso en grandes áreas de cultivos, frutales, bosques y otros ambientes para el control de plagas de

insectos, malezas y enfermedades de las plantas, ha representado una nueva amenaza para la apicultura (Sanchez-Bayo & Goka, 2016).

La variedad y cantidad de pesticidas empleados en el mundo ha aumentado dramáticamente en los últimos años, como resultado del aumento de la producción de cultivos. A nivel mundial, se rocían anualmente 4,6 millones de toneladas de pesticidas, los que afectan los cursos de agua, el medio ambiente (Zhang *et al.*, 2011) y a muchas especies no blanco (Murphy, 1986; Sanchez-Bayo & Goka, 2016). Por lo tanto, si bien los pesticidas son importantes en la agricultura para proteger los cultivos y mejorar la productividad, tienen el potencial para causar efectos nocivos según los niveles de exposición. Esto ha llevado a la implementación de normas legales, en referencia a las restricciones y prohibiciones en el uso de ciertos pesticidas en diferentes países del mundo (Waite, 1975; Schaerer, 1996; Handford *et al.*, 2015).

El término pesticida cubre una amplia gama de compuestos incluyendo, entre otros, insecticidas, fungicidas y herbicidas (Horsak *et al.*, 1964; Aktar *et al.*, 2009). Se estima que alrededor de un 44% de los pesticidas utilizados en el mundo son insecticidas, siguiéndole los herbicidas con un 30% y los fungicidas con el 21% (Aktar *et al.*, 2009). Por el contrario, en Uruguay los herbicidas representan alrededor del 71%, los fungicidas casi el 14% y los insecticidas cercanos al 9% (MGAP, 2019). Por su propia naturaleza, los insecticidas son los compuestos más tóxicos para las abejas (Sanchez-Bayo & Goka, 2016).

3.6.1. Neonicotinoides

Los insecticidas neonicotinoides se registraron por primera vez para su uso a mediados de la década de los 90. Desde entonces, estos productos químicos se han adoptado ampliamente para su uso en cultivos de azúcar, algodón, colza, cereales, arroz, frutas, hortalizas y plantas ornamentales (Elbert *et al.*, 2008). Los principales neonicotinoides actualmente en el mercado son imidacloprid, tiametoxam, clotianidina, tiacloprid, dinotefurano, acetamiprid, nitenpiram y sulfoxaflor (Tomizawa & Casida, 2003; Cutler *et al.*, 2013).

La estructura común de los neonicotinoides consta de tres partes: el farmacóforo, la cadena puente y el grupo heterocíclico (Fig. 14A) (Maienfisch *et al.*, 1999; Jeschke *et al.*, 2011; Terali, 2018). En general, el farmacóforo puede estar representado por el grupo N-C (X) = Y, donde Y es un grupo captador de electrones y X es igual a N, O, C o S. En particular, el farmacóforo influye en la actividad biológica, la estabilidad fotolítica, la degradación en el suelo del insecticida, así como también es responsable de su metabolismo en las plantas y del nivel de toxicidad para las abejas. Por consiguiente, las diferencias en estas propiedades tienen un impacto importante en el uso práctico y en el rendimiento a nivel de campo de estos insecticidas (Maienfisch *et al.*, 1999; Nauen *et al.*, 2001). Por otra parte, el grupo metileno se

usa normalmente como cadena puente. Otros grupos como el etileno o el grupo metileno sustituido disminuyen la actividad biológica. Adicionalmente, modificaciones sucesivas han demostrado también la gran influencia del grupo heterocíclico en la actividad biológica. Particularmente, según su grupo heterocíclico, los neonicotinoides se pueden agrupar en cuatro generaciones (Fig. 14B) (Maienfisch *et al.*, 1999). Los neonicotinoides de primera generación (subclase: cloropiridilo): imidacloprid, nitenpiram, acetamiprid y tiacloprid tienen como elemento estructural heterocíclico esencial un grupo 6-cloro-3-piridilmetil. Por su parte, el tiametoxam y la clotianidina son neonicotinoides de segunda generación (subclase: clorotiazol), ya que el grupo anteriormente mencionado es reemplazado por un grupo 2-cloro-5-tiazolil. Como neonicotinoide de tercera generación (subclase: furanilo), encontramos al dinotefurano el cual carece por completo del grupo cloropiridilmetil aromático y en su lugar posee un anillo de oxolano alifático (tetrahidrofurano) (Maienfisch *et al.*, 1999; Wakita *et al.*, 2003; Kagabu, 2011; Wang *et al.*, 2018; Anadón *et al.*, 2020). Finalmente, encontramos al sulfoxaflor, el cual es un neonicotinoide de cuarta generación (subclase: sulfoximina) (Cutler *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018; Anadón *et al.*, 2020).

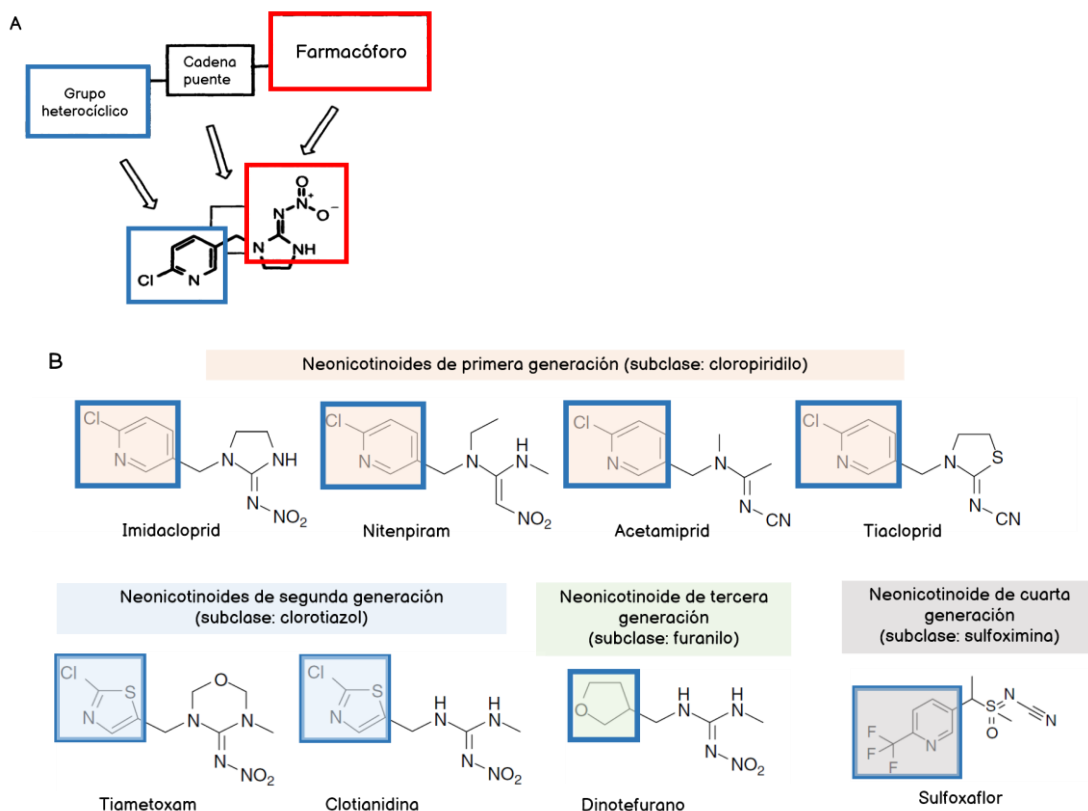


Figura 14. Elementos estructurales de los neonicotinoides (A) y su clasificación en generaciones según su grupo heterocíclico (B). El recuadro azul marca el grupo heterocíclico mientras que los distintos colores destacan específicamente cual es el grupo heterocíclico según la generación del pesticida (color naranja primera generación-subclase: cloropiridilo, color celeste segunda generación-subclase clorotiazol, color verde tercera generación-subclase: furanilo y color gris cuarta generación-subclase: sulfoximina).

Fuente: Adaptado de: Maienfisch *et al.*, 1999; Wakita *et al.*, 2003; Jeschke *et al.*, 2011; Cutler *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018.

Los neonicotinoides son una forma sintética de nicotina, insecticida natural, ya que se dirigen a los mismos receptores en el sistema nervioso de los insectos (Fairbrother *et al.*, 2014). Estos químicos imitan al neurotransmisor acetilcolina y son altamente neurotóxicos (Matsuda *et al.*, 2001; Blacquiere *et al.*, 2012; Van der Sluijs *et al.*, 2012). La diversidad en el tipo de receptores de acetilcolina en las poblaciones de abejas melíferas contribuye a la sensibilidad diferencial y a la resiliencia de estos insectos a la exposición a los neonicotinoides (Fairbrother *et al.*, 2014).

En la actualidad los neonicotinoides se encuentran registrados a nivel mundial en más de 120 países y son efectivos contra una amplia gama de insectos chupadores, masticadores como escarabajos y algunos lepidópteros, particularmente gusanos cortadores (Elbert *et al.*, 2008; Jeschke *et al.*, 2011; Kundoo *et al.*, 2018). Hoy en día, aproximadamente el 60% de todas las aplicaciones de neonicotinoides son tratamientos sobre suelo/semillas, y la mayoría de las aplicaciones de rociado están especialmente dirigidas contra plagas que atacan cultivos como cereales, maíz, arroz, verduras, remolacha azucarera, papas y algodón (Elbert & Nauen, 2004; Elbert *et al.*, 2008).

3.6.1.1. Vías de exposición de las abejas melíferas a los neonicotinoides

Los neonicotinoides son insecticidas con propiedades sistémicas (Hopwood *et al.*, 2012; Simon-Delso *et al.*, 2015), es decir, que estos compuestos pueden penetrar en los tejidos vegetales y trasladarse a través de la piel de frutas y verduras o plantas. La translocación de estos pesticidas sistémicos puede tener lugar a través de los tejidos de transporte del floema o xilema en las plantas vasculares (Hou *et al.*, 2016). Por otra parte, la forma de aplicación de estos insecticidas puede ser mediante spray foliar o como recubrimiento de semillas. Además, la toxicidad de los neonicotinoides puede variar según la planta, su etapa de crecimiento y la cantidad aplicada (Fairbrother *et al.*, 2014).

La vía principal de exposición de las abejas a los neonicotinoides es a través de los residuos presentes en el polen y néctar (Fig.15). Se ha evidenciado que muchas plantas cultivadas a partir de semillas tratadas así como el suelo contienen residuos de neonicotinoides, ocasionando que los propios recursos alimenticios de las abejas sean una fuente posible de exposición (Pohorecka *et al.*, 2012; Cowles & Eitzer, 2017; Woodcock *et al.*, 2021). Esto tiene un gran impacto sobre el desarrollo y la supervivencia de las abejas, ya que las mismas dependen en gran medida de la disponibilidad de recursos florales para obtener sus nutrientes (Di Pasquale *et al.*, 2013). El néctar es la fuente natural de carbohidratos, el cual es recolectado por las abejas de las plantas, transportado a la colmena y finalmente almacenado en celdas selladas como miel (Brodschneider & Crailsheim, 2010). Por su parte, el polen proporciona la mayoría de las proteínas, los aminoácidos, las grasas, las vitaminas y los requisitos minerales

de la dieta de una abeja (Somerville, 2000). Dentro de la colmena, el polen y el néctar son almacenados y utilizados para producir alimento para la reina, la cría en desarrollo y las abejas (Fisher & Moriarty, 2014).

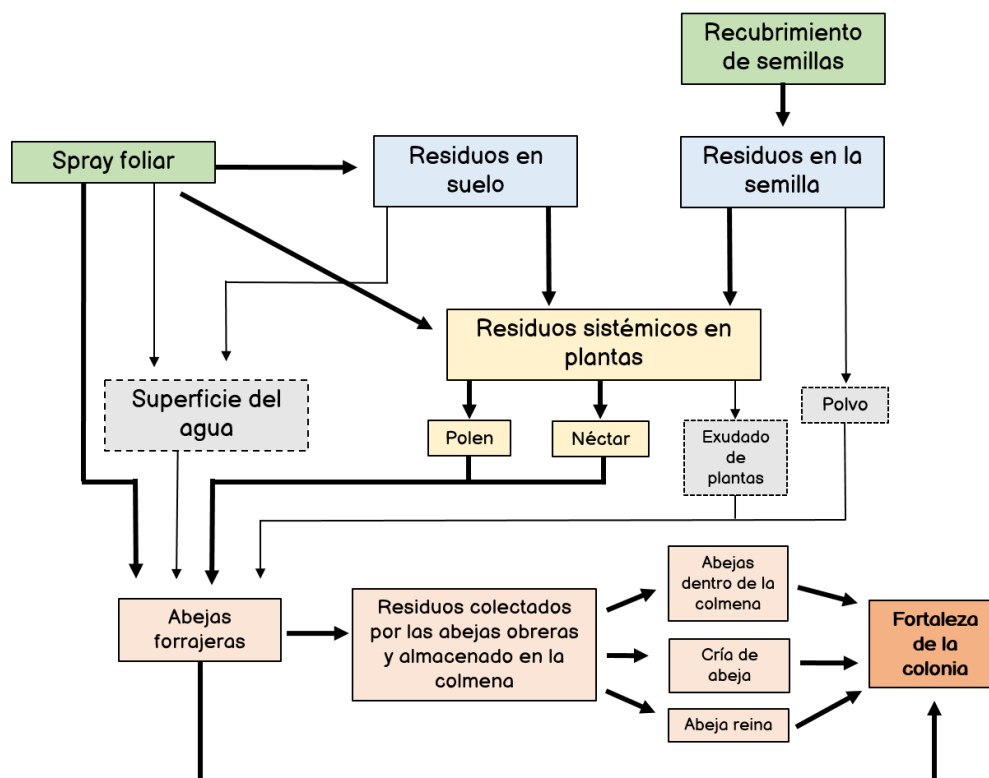


Figura 15. Rutas de exposición de las abejas melíferas a los neonicotinoides. Las rutas primarias de transferencia de residuos se indican con flechas gruesas y las rutas menores con flechas delgadas. Fuente: Adaptado de: Fairbrother *et al.*, 2014; Fisher & Moriarty, 2014.

Otra vía posible es a través de los exudados de las plantas, como por ejemplo el líquido de gutación (Fig.15) (Tapparo *et al.*, 2011; Schmolke *et al.*, 2018). Este líquido es producido, particularmente en las primeras etapas de crecimiento, por una gran variedad de plantas debido a la presión de las raíces en condiciones de exceso de humedad en el suelo y a una alta humedad en el aire (Hughes & Brimblecombe, 1994; Singh, 2014). Dicho líquido es por tanto, el agua que desprenden las plantas como gotas o alrededor de los bordes de sus hojas (Girolami *et al.*, 2009) y puede contener neonicotinoides translocados de las raíces siendo una fuente potencial de exposición si las abejas recolectan este líquido como fuente de agua (Solomon & Stephenson, 2017).

Las aguas superficiales, son otra vía de exposición de las abejas a los neonicotinoides al ser utilizadas como fuente de agua (Fig.15) (Hopwood *et al.*, 2012). Se estima que las abejas pueden transportar 40 mg de agua en un viaje de búsqueda de alimento (Visscher *et al.*, 1996). Por consiguiente, las abejas melíferas pueden estar expuestas a los neonicotinoides cuando recolectan agua, así como el líquido de gutación, para básicamente cuatro usos principales:

beber, regular la humedad de la colonia, diluir la miel y enfriar la temperatura corporal (Abou-Shaara, 2012).

La exposición de las abejas también puede ocurrir a través del polvo liberado de los tratamientos de semillas durante la siembra (Fig.15) (Greatti *et al.*, 2003; Georgiadis *et al.*, 2012; Solomon & Stephenson, 2017). Si las exposiciones son lo suficientemente grandes, se puede exceder el umbral de toxicidad dérmica, pero es más probable que el polvo contamine el polen o las abejas lo lleven de regreso a la colmena, donde podrían producirse exposiciones secundarias (Solomon & Stephenson, 2017). Adicionalmente, si la concentración del insecticida es lo suficientemente alta, los efectos tóxicos sobre las abejas forrajeras, las abejas de la colmena, la cría de abejas o la reina pueden resultar en una reducción de la fecundidad de la reina, del éxito en el desarrollo de la cría o de la supervivencia de las abejas adultas. Asimismo, si estos efectos son lo suficientemente graves o se prolongan en el tiempo puede producirse un efecto negativo en la fortaleza de la colonia (Fisher & Moriarty, 2014).

3.6.2. Imidacloprid

En 1991 el insecticida imidacloprid fue lanzado por Bayer CropScience como el precursor de los neonicotinoides y desde entonces se ha vendido en todo el mundo. Existen comercialmente varias marcas, por ejemplo, Admire, Gaucho, Confidor, Premise, Prothor y Winner. El mercado global de imidacloprid ha tenido una tendencia ascendente logrando aumentos masivos de uso en más de 140 cultivos en todo el mundo (Jeschke *et al.*, 2011). Este neonicotinoide se aplica principalmente como recubrimiento de semillas o aplicaciones sobre el suelo (Mullins, 1993; Jiang *et al.*, 2018).

En los insectos, el imidacloprid tiene una alta afinidad agonista por los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Schmuck *et al.*, 2003; Elbert *et al.*, 2008). Dichos receptores desempeñan funciones vitales en la transmisión sináptica en el sistema nervioso central ya que la acetilcolina es un neurotransmisor excitador en el cerebro de los insectos (Gauthier, 2010). Esta activación provoca un flujo de iones de sodio y la generación de potenciales de acción. En condiciones fisiológicas normales, la acción sináptica de la acetilcolina es interrumpida por la enzima acetilcolinesterasa, la cual hidroliza rápidamente el neurotransmisor (Yu, 2008). Debido a que este insecticida no es hidrolizado ni destruido por dicha enzima, la activación persistente conduce a una sobreestimulación de las sinapsis colinérgicas, lo que resulta en hiperexcitación, convulsiones, parálisis y, finalmente, la muerte del insecto (Okazawa *et al.*, 1998; Yu, 2008).

El imidacloprid es un pesticida neonicotinoide sistémico para cultivos el cual es utilizado para controlar una amplia gama de plagas como insectos chupadores (pulgones, moscas blancas, entre otros), coleópteros (escarabajos, gusanos blancos, entre otros) y especies seleccionadas

de dípteros y lepidópteros. También se ha demostrado actividad para hormigas, termitas, cucarachas, saltamontes y grillos (Mullins, 1993). Desafortunadamente, si bien es eficaz para el manejo de plagas también se ha visto que afecta a especies de insectos no objetivo, como las abejas melíferas (Jones & Sattelle, 2010). Este hecho ha sido reafirmado por Mitchell y colaboradores (2017), en donde fue evaluada la exposición global de las abejas melíferas a los neonicotinoides (acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiacloprid y tiametoxam) analizando casi 200 muestras de miel de todo el mundo. Ellos evidenciaron que al menos uno de estos compuestos fue encontrado en el 75% de todas las muestras, 2 o más en el 45% y 4 o 5 en el 10%. Particularmente, el imidacloprid fue el compuesto más frecuentemente detectado (51% de las muestras), lo que confirma el alto riesgo de exposición de las abejas melíferas a este insecticida.

3.6.2.1. Efectos de la exposición del imidacloprid sobre las abejas melíferas

Se pueden medir dos tipos de efectos perjudiciales de los insecticidas sobre los organismos: efectos letales y subletales. Un efecto letal se manifiesta como una mayor tasa de mortalidad entre las abejas dosificadas en comparación con los controles sin dosificar. Por su parte, un efecto subletal se manifiesta en colonias o individuos expuestos a una dosis/concentración subletal, definida como la concentración que no ocasiona una mortalidad estadísticamente significativa respecto al grupo control (Desneux *et al.*, 2007).

Por consiguiente, en organismos no objetivos expuestos a pesticidas, los efectos letales (mortalidad directa) son relativamente fáciles de detectar, sin embargo, los efectos subletales, más difíciles de identificar, probablemente sean más comunes. Los efectos subletales de la exposición a pesticidas pueden incluir reducción del crecimiento, desarrollo, fecundidad, deterioro del sistema inmunológico, comportamiento alterado, entre otros (Desneux *et al.*, 2007; Boina *et al.*, 2009).

3.6.2.1.1. Efectos letales del imidacloprid en las abejas melíferas

Generalmente, la exposición de las abejas a dosis letales de imidacloprid desencadena agitación, contracciones tetánicas con temblores intensos, convulsiones corporales, parálisis y finalmente la muerte de las abejas (Lunardi *et al.*, 2017). El parámetro comúnmente utilizado en estos estudios es la dosis letal 50 (DL_{50}), aquella dosis necesaria para matar al 50% de los individuos de una población (Stenersen, 2000). Dicha dosis varía según la vía de exposición, si es oral o por contacto, y la genética de las abejas. En abejas de origen europeo, la DL_{50} vía oral del imidacloprid tiene un rango de 0,0037 a 0,0409 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ mientras que la DL_{50} por contacto oscila entre 0,0597 a 0,2426 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ (Schmunck *et al.*, 2001; EFSA, 2013; IUPAC, 2021). Por otra parte, se ha evidenciado en abejas africanizadas que la DL_{50} vía oral es de 0,08092 \pm 0,0135 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ mientras que por contacto es 0,0626 \pm 0,0080 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ (Lunardi *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en el trabajo realizado por Bovi y colaboradores (2018) se observó que la DL₅₀ oral y por contacto del imidacloprid en abejas africanizadas fue $0,1079 \pm 0,0375$ y $0,0308 \pm 0,0218$ $\mu\text{g}/\text{abeja}$, respectivamente. Estos cambios en los valores de DL₅₀ pueden ocurrir debido a la variabilidad genética de las abejas, a la diferencia en su capacidad de desintoxicación y a diferencias metodológicas en los estudios (Suchail *et al.*, 2001).

3.6.2.1.2. Efectos subletales del imidacloprid en abejas melíferas

La muerte no es el único resultado de la exposición de las abejas al imidacloprid (Desneux *et al.*, 2007). Este insecticida puede ocasionar diversos grados de afección, dependiendo de la concentración a la que estén expuestas. En un estudio realizado por Bortolotti y colaboradores (2003) se observó que concentraciones de 500-1000 ppb ocasionan la desaparición completa de las abejas tratadas, a 1000 ppb la actividad de forrajeo cesa mientras que a 100 ppb se ve afectada temporalmente y a 50 ppb se compromete el rendimiento en el aprendizaje de las abejas. Decourtye y colaboradores (2004) informaron que niveles de imidacloprid tan bajos como 10 ng/abeja ocasionan una disminución del consumo de alimentos y de la actividad de las abejas forrajeras, así como una reducción del área de cría y de las reservas de miel y polen. Otro efecto que también ocasiona este insecticida es la pérdida de la inmunocompetencia en las abejas adultas (Brandt *et al.*, 2016).

Este neonicotinoide en presencia del microsporidio *Nosema ceranae* debilita significativamente a las abejas de origen europeo, y en corto plazo ocasiona altas tasas de mortalidad y estrés energético. Al ser cuantificada la inmunidad tanto a nivel individual como colectivo, se observó que ni el número de hemocitos ni la actividad de la fenoloxidasa de los individuos se vieron afectados. Sin embargo, la actividad de la glucosa oxidasa, la cual permite a las abejas esterilizar la colmena y alimentar a la cría, disminuyó significativamente. La caída de dicha actividad enzimática ocasionó a largo plazo una mayor susceptibilidad de la colmena a los patógenos (Alaux *et al.*, 2010a).

3.7. Mecanismos defensivos de las abejas melíferas

Los insectos sociales, como las abejas, son particularmente vulnerables a la transmisión de patógenos, exposición a pesticidas y a una mala nutrición (Albo *et al.*, 2016). Como consecuencia, han desarrollado diversos mecanismos de defensa que no solo se limitan a la respuesta inmunitaria individual, sino que también incluyen defensas sociales o colectivas (Evans & Spivak, 2010; Wu *et al.*, 2013; Kurze *et al.*, 2016). Por lo tanto, los mecanismos de defensa social e individual combinados de *A. mellifera* son necesarios para enfrentar cualquier amenaza que pueda comprometer la aptitud de la colonia.

3.7.1. Colectivos

Las abejas melíferas son especialmente vulnerables a los patógenos debido a la homogeneidad de la colonia, la proximidad y las interacciones extensas entre sus miembros (Naug & Camazine, 2002). Adicionalmente, el tamaño y la densidad poblacional dentro de la colonia son dos parámetros epidemiológicos críticos que también impactan sobre la persistencia y la transmisión de patógenos (Anderson & May, 1986). A pesar de esto, la organización social también ofrece el potencial de actuar como una barrera eficaz contra la transmisión de patógenos dentro de la colonia (Naug & Camazine, 2002). Las abejas tienen una serie de mecanismos defensivos que surgen de la asistencia entre individuos de la colonia que ayudan a prevenir la propagación de enfermedades. Estas defensas de la colonia proporcionarán un sistema de "inmunidad social" (Albo *et al.*, 2017), el cual involucra los mecanismos conductuales, organizacionales y fisiológicos que las abejas utilizan para defenderse de patógenos y de esta manera lograr mantener la salud de la colonia (Cremer *et al.*, 2007).

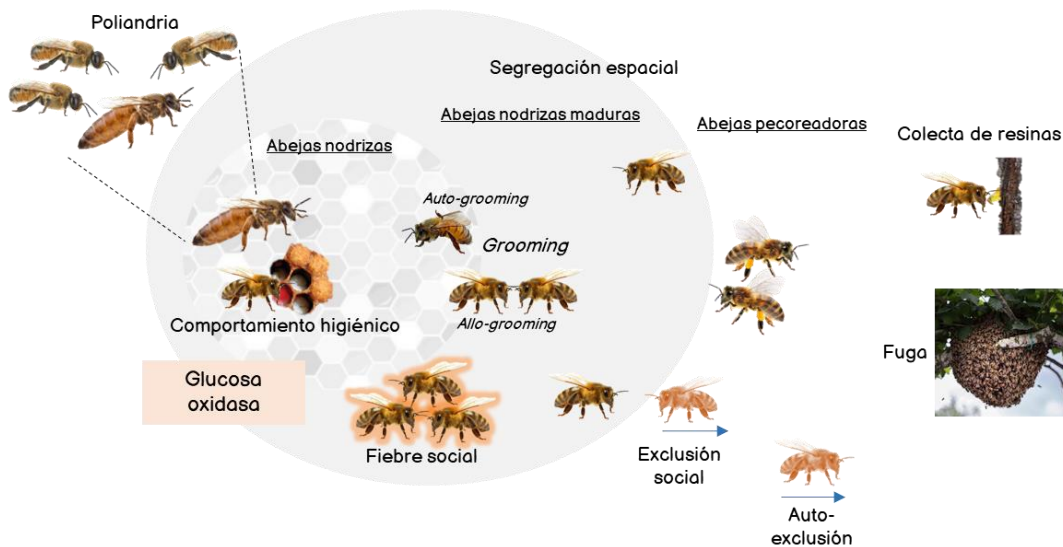


Figura 16. Mecanismos defensivos colectivos utilizados por las abejas melíferas contra patógenos, los cuales incluyen: la segregación espacial, la colecta y uso de resinas, el comportamiento higiénico, la fuga, el *Grooming* (*Allo* y *Auto-grooming*), la fiebre social, poliandria y la exclusión de individuos (abejas en rojo). Fuente: Adaptado de Gómez-Moracho *et al.*, 2017; Simone-Finstrom, 2017.

A nivel colectivo, encontramos varios mecanismos defensivos como la recolección de resinas, la segregación espacial, la poliandria, la exclusión social, la auto-exclusión (Gómez-Moracho *et al.*, 2017) y finalmente la fuga (Winston *et al.*, 1979) (Fig. 16). Para prevenir infecciones, las abejas obtienen sustancias antimicrobianas de resinas vegetales, las cuales son mezcladas con cera en una pasta conocida como propóleos y esparcidas dentro de la colmena (Simone *et al.*, 2009; Simone-Finstrom & Spivak, 2010). Otra estrategia social es la segregación espacial ya que la división del trabajo entre las abejas obreras tiene un efecto clave contra la propagación de patógenos y parásitos dentro de la colmena (Simone-Finstrom, 2017). Por lo general, como fue

mencionado anteriormente, las abejas obreras primero limpian las celdas, luego pasan al cuidado de la reina y la cría (enfermeras o nurse), posteriormente al mantenimiento de la colonia y al manejo del néctar, seguido de la búsqueda de alimento o forrajeo (Johnson, 2010). Dicha división permite que las abejas más jóvenes (las cuales realizan las tareas "internas") estén más protegidas de enfermedades al interactuar muy poco con las abejas pecoreadoras o forrajeras quienes tienen un mayor riesgo de exposición a patógenos por salir de la colmena en busca de alimento (Simone-Finstrom, 2017).

Otra defensa importante para reducir la carga de patógenos a nivel colonial es el apareamiento múltiple (poliandria), en el cual la reina se aparea con varios zánganos (Fig. 16) (Palmer & Oldroyd, 2003). Este hecho hace que aumente el nivel de variabilidad genética dentro de la colonia al generar líneas paternas separadas (es decir, grupos de abejas que comparten el mismo padre) con diferentes susceptibilidades a parásitos y patógenos, lo que potencialmente reduce su propagación dentro de la colonia (Bailey, 1999; Tarpy & Seeley, 2006; Tarpy *et al.*, 2013). Adicionalmente, existe el fenómeno de auto-exclusión en donde las abejas parasitadas abandonan espontáneamente la colonia para evitar que esta se contamine más (Rueppell *et al.*, 2010). Por el contrario, otro mecanismo es el denominado exclusión social en donde la abeja enferma es excluida de la colmena (Gómez-Moracho *et al.*, 2017). Otra estrategia defensiva es la fuga en donde la colonia entera abandona la colmena formando un enjambre y se restablece en otro lugar (Winston *et al.*, 1979). La fuga es un rasgo más común en las abejas africanizadas y algunas abejas asiáticas, aunque también ocurre en la abeja europea (Winston *et al.*, 1983). Los principales factores para la fuga de una colonia son la falta de alimento, pesticidas, ataque de parásitos y enfermedades, temperaturas demasiado altas o bajas, entre otras causas (Nurie, 2020).

Otros mecanismos defensivos de las abejas son el comportamiento higiénico, el "*grooming*" o acicalamiento y la fiebre social (Cremer *et al.*, 2007) (Fig. 16). Esta última, consiste en que las abejas mueven los músculos de sus alas simultáneamente para aumentar la temperatura dentro de la colmena a niveles que son letales para los parásitos, pero no para ellas (Starks *et al.*, 2000). Por su parte, el comportamiento higiénico refiere a la capacidad que tienen las abejas para detectar y remover a las crías enfermas y parasitadas dentro de la colmena (Spivak & Downey, 1998; Spivak & Gilliam, 1998; Wilson-Rich *et al.*, 2009). En colonias que exhiben un comportamiento higiénico rápido, las abejas adultas detectan larvas y pupas enfermas o parasitadas antes de que alcancen la etapa infecciosa. La larva o pupa se elimina de la colonia junto con el patógeno o parásito, lo que reduce la propagación de esa infección a través de la colonia. Esto tipifica la inmunidad social porque esa larva o pupa individual no se salva de la infección, sino que se elimina antes del desarrollo completo de los síntomas para prevenir la transmisión de esa enfermedad en toda la colonia (Simone-Finstrom, 2017). Adicionalmente, las abejas melíferas exhiben un comportamiento de aseo o *grooming* el cual puede ser útil para

eliminar patógenos como ácaros de su cuerpo. Cuando las abejas se acicalan y desprenden ácaros de sí mismas, esto se conoce como *auto-grooming* mientras que cuando las abejas acicalan a sus compañeras se conoce como *allo-grooming* (Jander, 1976; Rosenkranz *et al.*, 2010). Este comportamiento probablemente reduce el daño a la colonia, ya sea por la eliminación física del cuerpo de la abeja y/o por causarle daño a los ácaros, lo que los hace menos efectivos en el parasitismo (Spivak, 1996).

También participan enzimas como la glucosa oxidasa, la cual tiene funciones anti-bacterianas y antifúngicas a través de la producción de peróxido de hidrógeno (Wong *et al.*, 2008). Este producto antiséptico proporciona inmunidad social ya que permite a las abejas esterilizar la colonia y el alimento de la cría, y también ayuda a prevenir enfermedades a nivel colonial (Yang & Cox-Foster, 2005; Alaux *et al.*, 2010b). Si dichos mecanismos de defensa colectiva logran ser vencidos por algún patógeno, se pondrá en marcha la siguiente línea de defensa de la colmena, siendo la inmunidad individual.

3.7.2. Individuales

A nivel individual, la abeja cuenta con dos líneas de defensa para combatir patógenos (Fig. 16) (Gliński & Jarosz, 1995b). Dentro de la primera línea de defensa encontramos las barreras mecánicas y fisiológicas tales como la cutícula y la epidermis, las barreras intestinales y el sistema traqueal (Fig. 17) (Gliński & Jarosz, 1995b; Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001; Evans & Spivak, 2010). Por medio de su dureza y actividad antimicrobiana, la cutícula es resistente a las abrasiones que puedan generar una puerta de entrada para agentes infecciosos. Por otra parte, el desprendimiento de la epidermis le permite a la abeja eliminar bacterias, fragmentos de micelios y esporas de hongos que se encuentren sobre la superficie de su cuerpo (Gliński & Jarosz, 1995b). A nivel intestinal encontramos distintas barreras como la membrana peritrófica, las paredes del intestino o los inhibidores fisiológicos (cambios en el pH y otras condiciones químicas del intestino) los cuales en muchos casos previenen la adhesión, la entrada o el crecimiento de patógenos (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001; Evans & Spivak, 2010). Adicionalmente, la estructura de las tráqueas forma una barrera mecánica que inhibe el paso de patógenos traídos con el aire o polvo. El mecanismo de apertura y cierre de los espiráculos, una humedad relativa baja y la falta de sustratos alimenticios para el crecimiento bacteriano en las tráqueas constituyen una barrera defensiva contra los agentes invasores (Gliński & Jarosz, 1995b).

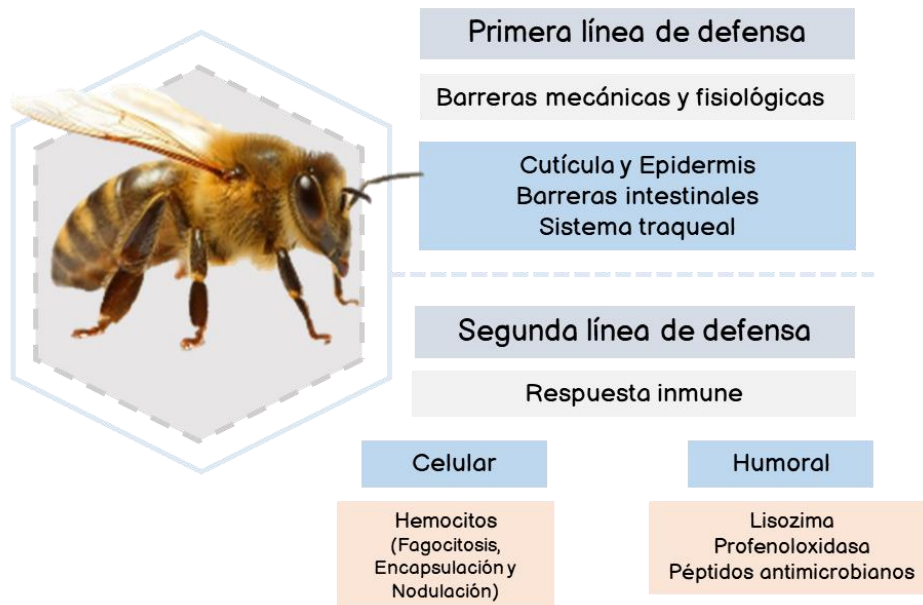


Figura 17. Mecanismos defensivos individuales presentes en la abeja para combatir patógenos. En la primera línea encontramos la cutícula, las barreras intestinales y el sistema traqueal de las abejas. Por su parte, en la segunda línea tenemos la respuesta inmune dividida en celular y en humoral. Fuente: Adaptado de: Gliński & Jarosz, 1995a; Gliński & Jarosz, 1995b y Gómez-Moracho *et al.*, 2017.

Como segunda línea de defensa tenemos la respuesta inmunitaria, la cual se divide en inmunidad celular y en inmunidad humoral (Fig. 17) (Gliński & Jarosz, 1995a; Gillespie *et al.*, 1997). Esta última es definida como el componente antimicrobiano no celular de la hemolinfa (Wilson-Rich *et al.*, 2009). En la defensa humoral participan las cascadas que regulan la coagulación y la melanización de la hemolinfa, así como la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (Lavine & Strand, 2001). También involucra a varias enzimas como la lisozima la cual se caracteriza por hidrolizar las paredes de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Dunn, 1986, Daffre *et al.*, 1994; Lavine & Strand, 2001) y promover la expresión de los péptidos antimicrobianos (Imler & Bulet, 2005). Otra enzima de interés es la fenoloxidasa la cual se encuentra bajo forma de proenzima (zimógeno) denominada profenoloxidasa (Cerenius & Söderhäll, 2004) y es activada en presencia de patógenos. Una vez activada, esta enzima participa en el proceso de melanización (Wyatt, 1961) y es responsable de encapsular patógenos como bacterias, hongos y virus (Nappi & Christensen, 2005). Por otro lado, se encuentran los péptidos antimicrobianos como la defensina (Casteels *et al.*, 1994), abaecina (Casteels *et al.*, 1990), himenoptecina (Casteels *et al.*, 1993) y apidecina (Casteels *et al.*, 1989).

Por su parte, las defensas celulares refieren a respuestas mediadas por hemocitos como fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos (Boman & Hultmark, 1987; Lavine & Strand, 2002). Para que esto ocurra es muy importante la participación de la lipoproteína vitelogenina, ya que ésta le proporciona a los hemocitos el zinc necesario para su función inmunológica (Amdam *et al.*, 2004; Salmela & Sundström, 2017). Esta lipoproteína también se encuentra

involucrada en los procesos de protección contra el estrés oxidativo, el envejecimiento de la abeja y la división de trabajo en la colmena (Nelson *et al.*, 2007).

3.8. Microbiota intestinal de las abejas melíferas

Como ocurre con muchas especies animales, las abejas melíferas dependen de su comunidad microbiana intestinal para estar saludables (Motta & Moran, 2020). Esta comunidad consiste en una mezcla de microorganismos benéficos, comensales y patógenos (Engel *et al.*, 2016; Raymann & Moran, 2018). La microbiota intestinal de las abejas se caracteriza por ser simple pero notablemente especializada, estable y compartimentada a lo largo del tracto digestivo (Moran, 2015; Kwong & Moran, 2016). La abundancia relativa y absoluta de los miembros de esta comunidad y sus interacciones determinarán la contribución general de la microbiota intestinal sobre la salud de estos insectos (Engel *et al.*, 2016).

El intestino de las abejas obreras adultas contiene una microbiota intestinal distintiva que está dominada por entre 7 a 9 grupos de especies bacterianas (Moran *et al.*, 2012; Moran, 2015), las cuales comprenden entre el 95% y el 99,9% de las bacterias en casi todos los individuos (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Martinson *et al.*, 2011; Corby-Harris *et al.*, 2014a). Las principales especies son: *Snodgrassella alvi* y *Gilliamella apícola* (bacterias Gram negativas, Filo: Proteobacteria) (Kwong & Moran, 2013), *Lactobacillus* Firm-4 y *Lactobacillus* Firm-5 (bacterias Gram positivas, Filo: Firmicutes), *Bifidobacterium* spp. (Filo: Actinobacteria) (Ellengaard *et al.*, 2015), *Frischella perrara* (Engel & Moran 2013), *Bartonella apis* (Kešnerová *et al.*, 2016), *Parasaccharibacter apium* (Filo: Proteobacteria) (Corby-Harris *et al.*, 2014b), recientemente reclasificada como *Bombella apis* (Smith *et al.*, 2021). Es importante destacar que las primeras cinco especies bacterianas anteriormente mencionadas conforman el núcleo o *core* al encontrarse presentes en la mayoría de las abejas de todo el mundo (Kwong & Moran, 2016; Raymann & Moran, 2018). Por otra parte, las bacterias pertenecientes a este *core* son relativamente poco frecuentes en larvas y reinas adultas, quienes contienen comunidades variables dominadas por bacterias ambientales. Específicamente la microbiota intestinal de la abeja reina se compone principalmente de la especie *Bombella apis* (anteriormente *Parasaccharibacter apium*) (Kapheim *et al.*, 2015; Tarpay *et al.*, 2015). También podemos encontrar bacterias pertenecientes a la familia Acetobacteraceae y bacterias *Lactobacillus* Firm-4 y Firm-5. Por su parte en los zánganos las bacterias dominantes son *Lactobacillus* Firm-4 y Firm-5 (Kwong & Moran, 2016).

La microbiota intestinal de las abejas obreras está compartimentalizada, y se encuentran diferentes especies en cada sector del tracto digestivo. Éste posee tres compartimentos: intestino anterior (*Foregut*), medio (*Midgut*) e intestino posterior (*Hindgut*) (Fig. 18). El intestino anterior contiene el buche (*Crop*), el intestino medio es la parte media del tracto y el intestino

posterior incluye el íleon y el recto (Kwong & Moran, 2016; Alatawy *et al.*, 2020). A nivel del buche se encuentran unas pocas bacterias, ya que principalmente es utilizado para el almacenamiento y transporte de néctar para la alimentación de larvas y la producción de miel. A lo largo del intestino medio también evidenciamos la presencia de unas pocas bacterias, principalmente localizadas en la región del píloro (punto de unión entre el midgut y el hindgut). En particular, a nivel del píloro encontramos a la bacteria *Frischella perrara*. Finalmente, en el intestino posterior encontramos la mayoría de las especies bacterianas, específicamente en el íleon hallamos a *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apícola*, *Lactobacillus* Firm-4 y *Lactobacillus* Firm-5, mientras que en el recto se encuentran principalmente *Lactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* Firm-5 y *Bifidobacterium* spp. (Martinson *et al.*, 2012; Kwong & Moran, 2016).

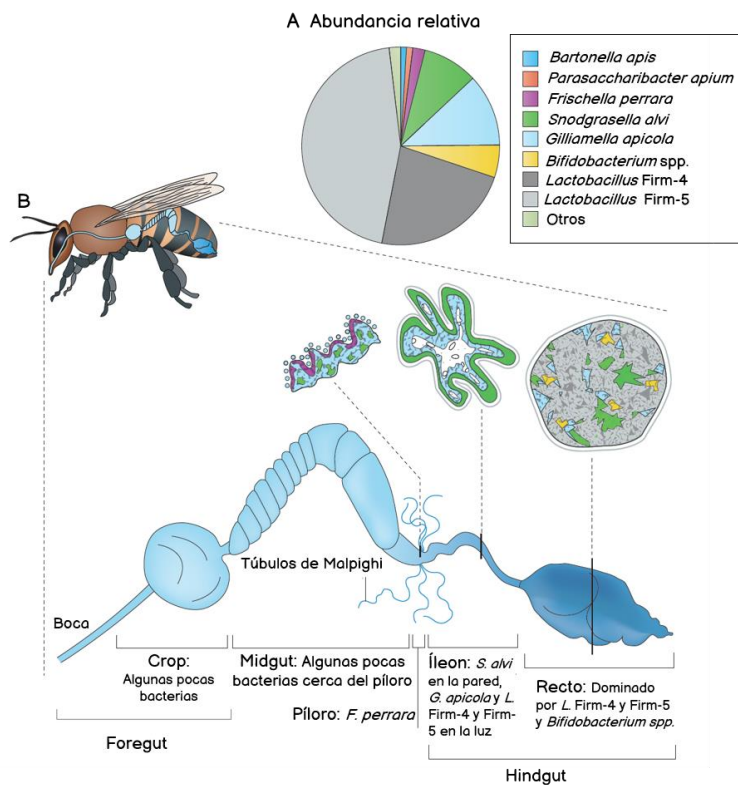


Figura 18. Composición y organización espacial de las comunidades bacterianas en el intestino de la abeja melífera. A. Composición típica de la microbiota de una abeja obrera adulta, basada en un perfil de comunidad promedio utilizando amplicones del gen de ARNr 16S de intestinos enteros (Moran *et al.*, 2012). B. Localización de las bacterias en los diferentes compartimentos del intestino, basada en estudios de hibridación in situ fluorescente (FISH) y qPCR (Martinson *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 2014). Fuente: Adaptado de Kwong & Moran, 2016.

Esta comunidad microbiana intestinal es adquirida por las abejas recién emergidas principalmente mediante trofalaxis. También puede ser adquirida a través del contacto directo con los materiales de la colmena y vía fecal-oral (Martinson *et al.*, 2012; *et al.*, 2014; Kwong & Moran, 2016a; Khan *et al.*, 2020).

La abundancia y estructura de la comunidad microbiana intestinal presentan variaciones según el estado nutricional, época del año y el ciclo de vida de las abejas (Castelli, 2016; Castelli *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2020; Castelli *et al.*, 2021a). Las larvas y las abejas recién emergidas apenas exhiben colonización bacteriana (Martinson *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 2014). Inicialmente, en las abejas recién emergidas la comunidad microbiana es pequeña y de composición errática, dominada por bacterias ambientales y sin diferenciación entre las regiones intestinales. En el tercer día, las comunidades contienen más de 10^7 bacterias, principalmente de las especies características del intestino de la abeja, y el íleon y el recto comienzan a mostrar composiciones comunitarias "normales". Estas comunidades se estabilizan en aproximadamente 10^9 bacterias a los 8 días (Kwong & Moran, 2016). A su vez, la comunidad microbiana intestinal a lo largo del desarrollo de las abejas se ve influenciada por distintos factores como la fisiología (muda repetida del tracto intestinal), el contacto social, el entorno y la dieta (Fig. 19) (Miller *et al.*, 2019).

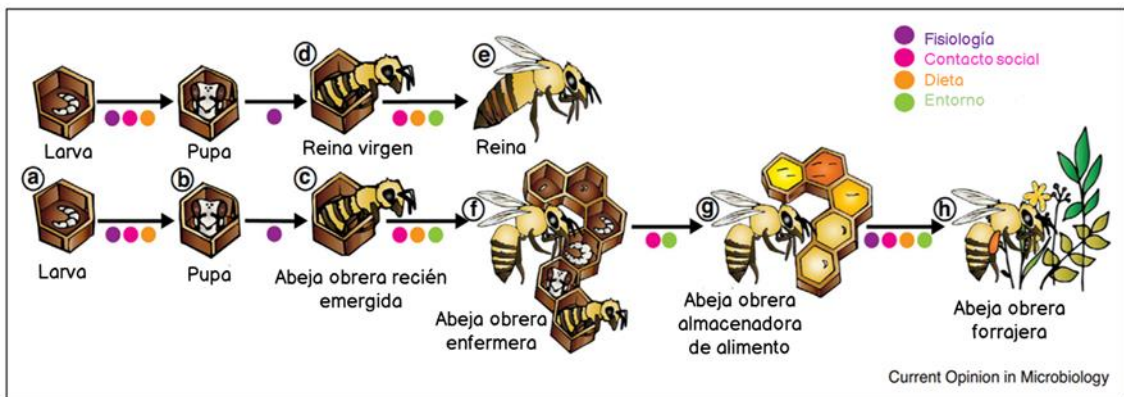


Figura 19. Factores que influyen en la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas a lo largo de su desarrollo; fisiología, contacto social, dieta y el entorno del huésped. Antes de la edad adulta, tanto la cría destinada a ser una abeja obrera como una abeja reina sufren cambios en la fisiología, la dieta y el grado de contacto social (a–b). Al emerger como abejas adultas, las reinas vírgenes y las obreras recién emergidas experimentan cambios diferentes en la dieta y la interacción social y son establecidas por comunidades microbianas intestinales diferentes (c–e). Por último, a medida que las abejas obreras hacen la transición entre tareas, experimentan cambios importantes en la fisiología, el contacto social, la dieta y la exposición ambiental, además de cambios menores en la abundancia y diversidad microbiana (f–h). Los círculos de colores representan factores que cambian en cada transición a lo largo del ciclo de vida de la abeja. Fuente: Adaptado de: Miller *et al.*, 2019.

Como fue mencionado previamente, cambios en la alimentación ocasionan modificaciones en la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas. Un aporte nutricional de mala calidad (polen de *Eucalyptus grandis*) ocasiona una menor abundancia de bacterias benéficas (*Lactobacillus mellifer*, *Lactobacillus apis* (Firm-4 y Firm-5, respectivamente) y de *Bifidobacterium* spp.) y una mayor abundancia de *Bartonella apis* con respecto a abejas alimentadas con una dieta de polen polifloral (Castelli *et al.*, 2020). Asimismo, la comunidad microbiana intestinal de las abejas se ve afectada por las distintas estaciones del año. En particular, la diversidad de esta comunidad es mayor en primavera y menor en verano e

invierno. Específicamente, bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* prevalecen en primavera mientras que *Gilliamella apicola* y *Snodgrassella alvi* predominan en verano e invierno. Además, las variables ambientales (principalmente las precipitaciones) también afectan la composición de la microbiota intestinal de las abejas melíferas (Castelli *et al.*, 2021a)

La microbiota intestinal tiene una estrecha relación con las abejas ya que le brinda varias ventajas, como promover la digestión de los alimentos, los nutrientes esenciales, la degradación de componentes tóxicos, la defensa frente a patógenos y la regulación del desarrollo, comportamiento e inmunidad (Tabla 1) (Moran *et al.*, 2003; Raymann & Moran, 2018; Khan *et al.*, 2020). Además, algunas de las bacterias pertenecientes a esta comunidad juegan un rol importante en la polinización ya que influyen en la eficiencia de la abeja como agente polinizador al poder cambiar la composición química del néctar y afectar el comportamiento de búsqueda de alimento (Good *et al.*, 2014). Por lo tanto, el equilibrio en la comunidad microbiana intestinal es clave para una correcta salud en las abejas melíferas. La alteración del mismo (disbiosis intestinal), favorece la invasión de patógenos y ocasiona altas tasas de mortalidad (Raymann & Moran, 2018). La disbiosis intestinal suele estar asociada con el desarrollo de enfermedades (Hamdi *et al.*, 2011) y factores estresantes como el uso de antibióticos y el contacto con pesticidas (Engel *et al.*, 2016).

Tabla 1. Lista seleccionada de funciones asociadas con la microbiota intestinal de las abejas melíferas. ^A Intestino de la abeja obrera a menos que se especifique lo contrario. Fuente: Adaptado de: Anderson & Ricigliano, 2017

Función inferida o demostrada	Bacteria	Localización ^A	Referencia
Adhesión del huésped / formación de biofilm	<i>Snodgrassella alvi</i>	Intestino/Íleon	Powell <i>et al.</i> , 2016
Protección de patógenos oportunistas	<i>Snodgrassella alvi</i>	Intestino/Íleon	Maes <i>et al.</i> , 2016
Cascada inmunitaria y melanización	<i>Frischella perrara</i>	Íleon/Píloro	Engel <i>et al.</i> , 2015
Estimulación de la respuesta inmune de la abeja adulta	Comunidad intestinal, <i>S. alvi</i>	Hindgut	Kwong <i>et al.</i> , 2017
Respuesta inmune diferencial de la abeja adulta	<i>F. perrara</i> , <i>S. alvi</i>	Íleon/Píloro	Emery <i>et al.</i> , 2017
Metabolismo de carbohidratos enriquecido	Comunidad intestinal	Hindgut	Engel <i>et al.</i> , 2012; Lee <i>et al.</i> , 2015
Digestión de carbohidratos complejos.	<i>Gilliamella apicola</i>	Intestino/Íleon	Engel <i>et al.</i> , 2012
Metabolismo de azúcares tóxicos	<i>G. apicola</i>	Intestino/Íleon	Zheng <i>et al.</i> , 2016
Aumento de la supervivencia de las larvas	<i>Bombella apis</i> (<i>Parasaccharibacter apisum</i>)	Colmena/larvas /intestino de abeja reina	Corby-Harris <i>et al.</i> , 2014b
Colonización temprana de especies pioneras	<i>Lactobacillus Firm-5</i>	Colmena/larvas /todas las castas	Anderson <i>et al.</i> , 2016
Señalización de insulina	Comunidad intestinal	Hindgut	Zheng <i>et al.</i> , 2017
Crecimiento y desarrollo	Comunidad intestinal	Hindgut	Maes <i>et al.</i> , 2016; Zheng <i>et al.</i> , 2017

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los neonicotinoides son actualmente la clase de insecticidas más utilizada en todo el mundo y son cada vez más frecuentes en entornos terrestres y acuáticos. Existe una creciente preocupación sobre su impacto no solo en organismos no blancos como abejas melíferas, abejas silvestres, invertebrados terrestres y acuáticos, sino también en vertebrados, incluidos los humanos. Existe evidencia que los neonicotinoides han sido detectados en distintas matrices de la colmena como miel, cera, polen, propóleo y abejas. A su vez, estos insecticidas han sido encontrados en agua y suelo, en los cuales pueden permanecer de meses a años (van der Sluijs *et al.*, 2015). Por otra parte, en más del 90 % de la literatura publicada después de 2009 se demostró directa o indirectamente los efectos adversos para la salud de las abejas melíferas la exposición subletal crónica a los neonicotinoides (Lu *et al.*, 2020).

Particularmente, en el trabajo publicado por Alaux y colaboradores (2010a) estudiaron el impacto de la exposición subletal crónica del imidacloprid a nivel de laboratorio con/sin la presencia del microsporidio *N. ceranae* sobre el sistema inmune y la supervivencia de las abejas melíferas europeas. Ellos evidenciaron que hubo una disminución de la glucosa oxidasa y que se afectó el número de hemocitos y la actividad de la fenoloxidasa. Además, observaron que hubo una mayor tasa de mortalidad en las abejas expuestas a ambos agentes, indicando un posible sinergismo entre ellos. A nivel de la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas europeas, existen resultados contrastantes. Mientras que en el trabajo publicado por Raymann y colaboradores (2018) no encontraron ningún efecto después de la exposición de las abejas melíferas europeas a una dosis subletal de imidacloprid durante 5 días, en el trabajo publicado por Rouzé y colaboradores (2019) encontraron que la exposición durante un período más largo (26 días) disminuyó significativamente la abundancia relativa de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp.

Como resultado, la pertinencia del uso de estos pesticidas se está cuestionando actualmente en muchos países, con una prohibición vigente implementada en Francia y Alemania para los neonicotinoides. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en un informe realizado en el año 2018 ha confirmado que tres polémicos insecticidas neonicotinoides: imidacloprid, clotianidina y tiametoxam, representan un riesgo para las abejas silvestres y las abejas melíferas. Para lograr demostrar esto, la EFSA tuvo que realizar la búsqueda de todos aquellos trabajos publicados a nivel mundial que traten esta problemática, evaluando 1599 documentos científicos. En la búsqueda de literatura actualizada, también se recuperaron algunos resultados de la EFSA anteriores y se utilizó la revisión científica externa de la FERA (Food and Environment Research Agency) del 2015. Basándose en el informe presentado por la EFSA del 2018, la Comisión Europea, tras recibir el respaldo de 15 Estados miembros, prohibió el uso de estos tres neonicotinoides tóxicos para las abejas por un periodo de 2 años.

Esta prohibición fue apelada por la empresa Bayer el 6 de mayo de 2021, pero el Tribunal de Justicia de la Unión Europea confirmó la decisión (Court of Justice of the European Union, 2021). Desafortunadamente, esta resolución no aborda un vacío legal utilizado por muchos estados miembros para continuar permitiendo su uso, la autorización en "situaciones de emergencia" donde "tal medida parece necesaria debido a un peligro que no puede ser contenido por ningún otro medio razonable" (Regulation n° 1107/2009; Epstein *et al.*, 2021). El reglamento no define qué constituye una emergencia. Dada esta falta de restricciones explícitas, varios estados miembros permiten la "autorización de emergencia" en cultivos importantes de manera recurrente, como ejemplo, en la remolacha azucarera, (European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, 2021).

Ante la falta de acciones por parte de los Estados miembros y la Comisión Europea, la PAN (Pesticide Action Network) de Europa ha sido uno de los impulsores de la iniciativa ciudadana "Europe Save Bees and Farmers". Esta iniciativa busca recolectar 1 millón de firmas en toda la UE para enviar a los tomadores de decisiones a respetar la ley y proteger a las abejas de los pesticidas. La iniciativa ya ha recogido más de 600.000 firmas (PAN Europe, 2021).

La prohibición del uso de los neonicotinoides requiere la identificación de métodos alternativos sostenibles y una comprensión de sus posibles inconvenientes. En un análisis exhaustivo de las alternativas a todos los usos específicos autorizados de los neonicotinoides en Francia se demostró que es posible reemplazarlos por métodos, técnicas y/o productos alternativos en la mayoría de los casos (96% de los casos). Sin embargo, es posible que los métodos alternativos no siempre coincidan con los neonicotinoides en términos de eficacia, aplicabilidad, durabilidad y/o viabilidad. Además, es posible que no sean necesariamente más seguros para el medio ambiente. La alternativa más común a los neonicotinoides (89% de los casos), de alta eficacia, aplicabilidad inmediata y practicidad, es el uso de otros insecticidas químicos, particularmente los pertenecientes a generaciones anteriores de sustancias, como los piretroides. Sin embargo, ya se dispone de herramientas que facilitan el desarrollo de nuevos sistemas de cultivo basados en el uso de unos pocos insecticidas químicos y, en el 78% de los casos, se identificó al menos una alternativa no química a los neonicotinoides. Los métodos sustituibles más prometedores implican el uso de microorganismos (por ejemplo, virus de la granulosis o bacterias, como *Bacillus thuringiensis*) para el control biológico (Jactel *et al.*, 2019). Los métodos físicos (por ejemplo, recubrir la fruta con aceite de parafina o arcilla; Vincent *et al.*, 2003) y los métodos semioquímicos (alteración del apareamiento con feromonas sexuales) también han demostrado ser bastante efectivos (Witzgall *et al.*, 2010) y, a menudo, están disponibles como productos comerciales.

La relevancia de las alternativas no químicas a los neonicotinoides dependerá en gran medida del tipo de alimentación que la plaga objetivo tenga. Las plagas que se alimentan de hojas y flores se manejan más fácilmente con métodos no químicos que otros grupos de plagas las cuales se alimentan de madera, cortezas y raíces. Este último grupo es fácilmente controlado por el modo de acción sistémico de los neonicotinoides. Por consiguiente, es clave poder llegar a conseguir un método no químico que permita combatir las plagas de madera y raíces, que son endófagos o viven debajo del suelo (Jactel *et al.*, 2019).

Por otra parte, a nivel nacional existen artículos publicados en relación al uso de pesticidas. En el trabajo realizado por Pareja y colaboradores (2011), se reportó la presencia de diferentes pesticidas, incluyendo el imidacloprid en panales, abejas, miel y propóleos de colmenas que sufrieron episodios de despoblación. Estos resultados preliminares sugieren que las abejas expuestas a pesticidas o a sus residuos pueden llegar de diferentes maneras a la colmena. En otro trabajo publicado por Neill y colaboradores (2015), también se analizaron diferentes matrices de la colmena (abejas, polen, cera y miel) en búsqueda de residuos de pesticidas debido a que el estudio por separado de las diferentes matrices de abejas proporciona una mejor comprensión de este problema. Cada matriz brindó diferente información, la cera es un depósito histórico de los pesticidas recolectados, mientras que los residuos en el polen son más diversos y representan lo que se ha rociado directamente sobre los cultivos. Por otro lado, los residuos de pesticidas en las abejas nos informan sobre las últimas aplicaciones de plaguicidas a las que estuvieron expuestas las abejas. Los datos presentados en este trabajo muestran que la información proporcionada por el perfil de residuos de pesticidas de cada matriz contribuye a tener una visión más amplia de la situación. Otro trabajo publicado por Neill y colaboradores (2017), investigó la transferencia de neonicotinoides del campo a la colmena mediante las abejas melíferas forrajeras y su distribución dentro de las matrices de la colmena: polen, miel y cera de abejas. En particular, el rango de concentración encontrado en abejas muertas a las 24 horas de aplicado el imidacloprid fue de 0,010-0,072 $\mu\text{g}/\text{abeja}$.

En 2019 se presentó el proyecto de ley titulado "Protección de la producción apícola", el cual busca prohibir el uso de ciertos pesticidas incluyendo al imidacloprid. En dicho proyecto se mencionan los motivos por los cuales se deberá prohibir su uso, mencionado los estudios realizados en el IIBCE en donde se estimó un 20-30% de pérdidas de colmenas por año. Menciona que el modelo agroindustrial desarrollado en los últimos 15 años, con un uso y abuso extensivo e intensivo de insecticidas y herbicidas, sin control de los eventuales impactos en la biodiversidad vegetal y animal ni en la salud humana, se ha asociado a un deterioro de la productividad de las colmenas. También alude a que estos productos tienen un efecto residual por más de dos años, lo que los lleva a una alta peligrosidad dada su persistencia en el hábitat de la abeja. Menciona que el imidacloprid es un insecticida con una amplia variedad de usos – suelos, cura de semillas y foliar; se utiliza para controlar a los insectos picadores y chupadores,

además de masticadores; puede usarse como baño para las semillas, como tratamiento de los suelos y como tratamiento foliar de diferentes cultivos, entre ellos, arroz, cereales, maíz, papas, vegetales, frutas cítricas, manzanas y peras y frutas de carozo. En este proyecto de ley se establece las sanciones en caso de incumplimiento con el propósito de proteger al sector apícola. En la actualidad, todavía sigue en espera de ser aprobada.

En esta línea, en 2019 la DGSA (Dirección General de Servicios Agrícolas) del MGAP decidió exigir una receta profesional para el uso de los neonicotinoides clotianidina, imidacloprid y tiametoxam así como para el organofosforado clorpirifos (Resolución n° 60/019, 2019), lo que les permite llevar un mejor control sobre su uso. En el año siguiente (2020) la DGSA solicitó también la declaración del stock de estos productos (Resolución n° 504/020, 2020).

En base a este contexto y teniendo en consideración que existe un mayor conocimiento generado sobre el impacto a nivel del sistema inmune y a nivel de la comunidad microbiana intestinal del imidacloprid y su asociación con *N. ceranae* en abejas europeas con respecto a las abejas africanizadas (recordar que se estima el 80 % de la población de abejas a nivel nacional son africanizadas). En esta tesis nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cuál es el impacto de la exposición subletal crónica del imidacloprid (con/sin *N. ceranae*) sobre la salud de las abejas melíferas africanizadas en Uruguay?. Para poder respondernos esta interrogante, decidimos exponer de manera crónica a dos dosis subletales distintas del imidacloprid a abejas melíferas africanizadas. Adicionalmente, buscamos evaluar al imidacloprid en simultáneo con un agente estresor importante y frecuentemente relacionado con las pérdidas de colmenas, el microsporidio *Nosema ceranae*. Además, cabe mencionar que posiblemente las colmenas se encuentran naturalmente infectadas con el virus DWV, por lo que también será considerado dentro de este ensayo. Los resultados obtenidos contribuirán a demostrar los efectos del imidacloprid por sí solo o acompañado de agentes estresores en la salud de las abejas melíferas africanizadas.

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. Hipótesis

La exposición subletal crónica al imidacloprid afecta la expresión de diferentes genes implicados en la respuesta inmune y la composición de la microbiota intestinal, favoreciendo la infección por patógenos y disminuyendo la supervivencia de las abejas melíferas africanizadas. A su vez, estos efectos son potenciados en presencia del microsporidio *Nosema ceranae*.

5.2. Objetivo General

Estudiar el efecto de la exposición subletal crónica al neonicotinoide imidacloprid con/sin el microsporidio *Nosema ceranae* en la salud de las abejas melíferas africanizadas.

5.3. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- 1) Analizar el efecto de la exposición subletal crónica al imidacloprid y su interacción con *N. ceranae* sobre la expresión de genes asociados a la respuesta inmune humoral, celular y social de las abejas melíferas africanizadas.
- 2) Investigar si la exposición subletal crónica al imidacloprid y su interacción con *N. ceranae* afecta el nivel de infección del virus de las alas deformes (DWV).
- 3) Evaluar si la exposición subletal crónica al imidacloprid afecta el nivel de infección del microsporidio *Nosema ceranae*.
- 4) Analizar si la exposición subletal crónica al imidacloprid y su interacción con el microsporidio *Nosema ceranae* es capaz de alterar la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas africanizadas.
- 5) Determinar el impacto de la exposición subletal crónica al imidacloprid y su interacción con *N. ceranae* en la supervivencia y en el consumo de jarabe de las abejas melíferas africanizadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estrategia experimental

Se realizó un ensayo a nivel de laboratorio en condiciones controladas para evaluar el efecto de la exposición crónica de dos dosis subletales del insecticida imidacloprid con/sin la presencia del microsporidio *N. ceranae* sobre la salud de abejas melíferas africanizadas. Para esto, se emplearon abejas recién emergidas, las cuales fueron distribuidas en seis grupos: un grupo se infectó con esporas de *N. ceranae*, dos grupos se expusieron a una dosis subletal del imidacloprid y otros dos grupos se expusieron a una dosis subletal del insecticida y al microsporidio, y el último grupo no recibió tratamiento (grupo control). Se tomaron muestras a distintos tiempos con el propósito de evaluar el efecto de estos tratamientos sobre: a) la expresión de genes asociados con el sistema inmunitario de las abejas y con el nivel de infección del DWV, b) el nivel de infección con *N. ceranae* y c) la comunidad microbiana intestinal. Además, se realizó el análisis de supervivencia y de consumo de jarabe en cada uno de los grupos conformados.

6.2. Purificación de esporas de *Nosema* spp.

Se preparó una suspensión de esporas de *N. ceranae* a partir de abejas melíferas infectadas naturalmente recolectadas por técnicos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Estas esporas fueron obtenidas mediante un método de centrifugación (Fries *et al.*, 2013). Dicho método consiste en extraer el intestino de las abejas y seleccionar el intestino medio (*midgut*) ya que es el compartimento donde se encuentra mayor abundancia de esporas del microsporidio. Los intestinos medios extraídos se colocaron en un tubo falcon, donde son macerados y homogeneizados en agua destilada estéril (0,1 ml por cada intestino medio). Luego, los mismos se filtraron a través de una gasa doble y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet (sedimento) en la misma cantidad de agua destilada anteriormente utilizada. A continuación, se centrifugó a 3.200g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Este último paso de lavado se repitió una vez más y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet en agua destilada estéril (0,05 ml por cada intestino medio) y se procedió a realizar el conteo de las esporas.

La determinación del número de esporas fue realizada mediante microscopía óptica en cámara de Neubauer (Human *et al.*, 2013) y la identificación de especies se realizó mediante PCR multiplex (Martin-Hernández *et al.*, 2007). Para la identificación de *N. ceranae* se emplearon los cebadores 218MITOC-F (5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA-3') y 218MITOC-R (5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG-3'), mientras que para *N. apis* se emplearon los cebadores 321APIS-F (5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3') y 321APIS-R (5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAATATG-3'). Las condiciones de ciclado consistieron en 0,4 μ M de cada cebador, 1X buffer, 0,4 mM de dNTPs (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂, 2 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 2,5 μ l de ADN en un volumen final de 25 μ l. El protocolo de ciclado consistió en 2 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C a 15 seg, 61,8°C a 30 seg y 72°C a 45 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 0,5X (Tris 5,4 g, ácido bórico 2,75 g, EDTA 0,5 M 2 ml por litro de agua destilada estéril pH 8). Posteriormente se tiñó con GelRed (Biotium, USA) y se visualizó mediante exposición a luz UV.

6.3. Preparación de dosis subletales de imidacloprid

Tomando como referencia la DL₅₀ reportada para el imidacloprid en abejas africanizadas (0,0809 \pm 0,0135 μ g/abeja, Lunardi *et al.*, 2017 y 0,1079 \pm 0,0375 μ g/abeja, Bovi *et al.*, 2018) y las dosis encontradas a nivel de campo en Uruguay (Niell *et al.*, 2017), se seleccionaron dos dosis subletales: dosis 1 = 0,1 μ g/ml y dosis 2 = 0,3 μ g/ml. Suponiendo que las abejas consuman 10 μ l/día de jarabe, estas dosis serían equivalentes a 0,001 μ g/abeja y 0,003 μ g/abeja, respectivamente. Se preparó una solución madre de imidacloprid (principio activo, Dr.

Ehrenstorfer, Alemania, código de producto DRE-C14283700) de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, disolviendo el principio activo en agua destilada estéril. Finalmente, se diluyó esta solución en jarabe de sacarosa al 50% hasta obtener una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la cual fue utilizada para preparar las soluciones de trabajo.

6.4. Diseño Experimental

En marzo de 2019 (verano), se seleccionaron cuadros de cría operculada de tres colmenas de abejas melíferas africanizadas sanas (híbridos locales entre *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica* y *A. mellifera scutellata*) pertenecientes a un apiario experimental ubicado en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (UdelaR). Las colonias no mostraron ningún síntoma clínico visible de enfermedad y el nivel de infestación por *V. destructor* y *N. ceranae* se determinó de acuerdo al Beebook (Dietemann *et al.*, 2013; Fries *et al.*, 2013, respectivamente). Los cuadros de cría operculada se colocaron en una incubadora simulando las condiciones encontradas en la colmena ($34\pm 1^\circ\text{C}$, 60% HR) para de esta forma estimular la emergencia de las abejas melíferas. Con el propósito de estandarizar la edad, solo se utilizaron las abejas que emergieron dentro de las primeras 24 horas. Las abejas fueron distribuidas aleatoriamente a medida que iban naciendo dentro de jaulas, las cuales se incubaron a $30\pm 1^\circ\text{C}$ con un 60% de humedad relativa en la oscuridad y se alimentaron con jarabe de sacarosa al 50% (Williams *et al.*, 2013).

Las abejas melíferas se dividieron en 6 grupos; un grupo control (i, alimentado exclusivamente con jarabe de sacarosa), un grupo infectado con *Nosema ceranae* (ii), dos grupos expuestos crónicamente a dosis subletales de imidacloprid (iii, 0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ y iv, 0,003 $\mu\text{g}/\text{abeja}$) y dos grupos infectados con *N. ceranae* y expuestos crónicamente a una dosis subletal de imidacloprid (v, 0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ y vi, 0,003 $\mu\text{g}/\text{abeja}$). El experimento se realizó por triplicado, con 70 abejas por jaula (Fig. 20).

Ensayo de laboratorio

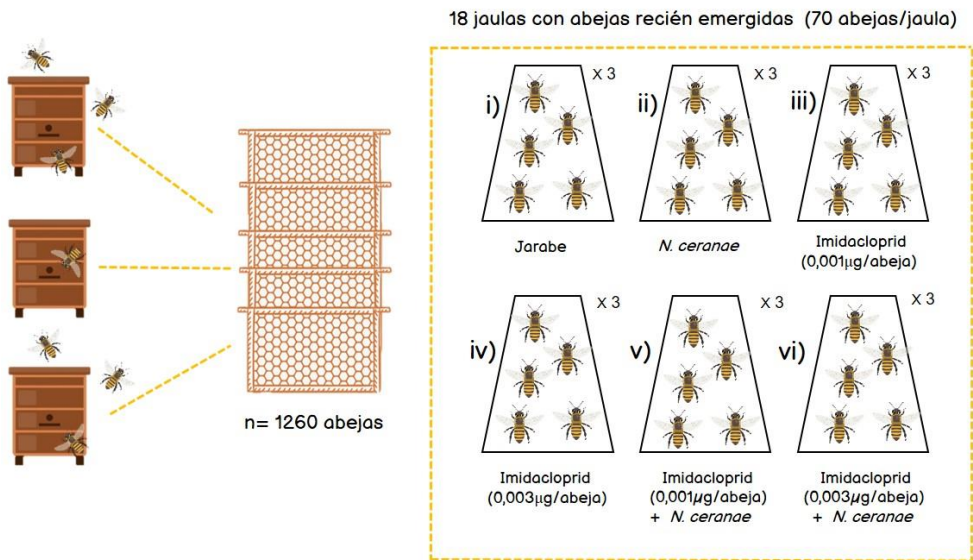


Figura 20. Diseño experimental del ensayo de toxicidad crónica. Las abejas se dividieron en 6 grupos de 70 individuos por jaula por triplicado.

En detalle, una vez conformados los 6 grupos, las abejas fueron sometidas a un periodo de ayuno de 2 horas para de esta forma asegurarnos que las abejas que deseábamos infectar consumieran toda la suspensión de esporas y que el resto de los grupos fueran sometidos al mismo estrés. Los individuos de los grupos ii, v y vi se infectaron colectivamente con jarabe de sacarosa al 50% (p/v) el cual contenía 10.000 esporas de *N. ceranae*/µl. Asumiendo que las abejas consumen 10 µl por día, cada abeja se infectó con 100.000 esporas. Por otro lado, las abejas melíferas de los grupos i, iii y iv se alimentaron únicamente con el jarabe de sacarosa. Veinticuatro horas después, las abejas melíferas de los grupos iii y v se alimentaron con jarabe de sacarosa contaminado con imidacloprid 0,1 µg/ml (dosis 1), las abejas melíferas de los grupos iv y vi se alimentaron con jarabe de sacarosa contaminado con imidacloprid 0,3 µg/ml (dosis 2) y las abejas melíferas de los grupos i y ii se alimentaron únicamente con jarabe de sacarosa. En todos los casos, el jarabe se consumió *ad libitum*. Todos los días las abejas melíferas se monitorearon, se retiraron los individuos muertos y se llevó su registro, se estimó el consumo de jarabe y se reemplazó por soluciones recién preparadas.

6.5. Análisis de expresión de genes vinculados con la inmunidad y cuantificación del DWV

6.5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se tomaron muestras de diez abejas recién emergidas y de 7 días de edad (tres o cuatro abejas por jaula) sometidos a diferentes tratamientos (i, ii, iii y v) y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, las abejas fueron homogeneizadas individualmente en tubos conteniendo perlas de cerámica, 600 µl de buffer de lisis y 6 µl de β-mercaptoetanol a una velocidad de 5,5 m/s durante 1 minuto en un equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA). El homogeneizado

obtenido se centrifugó a 13.375 rpm durante 3 minutos y los sobrenadantes se colocaron en tubos eppendorf. Se agregaron 600 μ l de etanol al 70% y se vortexeó. Luego, cada sobrenadante obtenido se transfirió a la columna de digestión de ADN genómico provista por el PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Carlsbad, EE.UU.). Posteriormente, se siguieron las instrucciones sugeridas por el fabricante para finalizar con la extracción de ARN. Con el fin de digerir posibles restos de ADN genómico que pudieran haberse filtrado en la columna, se añadió un paso de digestión de ADN genómico adicional utilizando la enzima DNAsa I (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se utilizó como plantilla para la síntesis de ADNc utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Foster city, EE.UU.), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADNc obtenido se diluyó al décimo en agua destilada estéril y se conservó a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

6.5.2. PCR cuantitativa (qPCR)

La expresión relativa de genes implicados en la respuesta inmune (himenoptecina, glucosa oxidasa, lisozima y profenoloxidasa) y vitelogenina se evaluó mediante qPCR utilizando cebadores previamente reportados (Tabla 2). El nivel de infección por DWV también se evaluó mediante qPCR (Kukielka *et al.*, 2018). La proteína ribosómica S5 (RPS5) y la β -actina se amplificaron para ser considerados como genes de referencia para normalizar la variación de los niveles de ADNc (Yang & Cox-Foster, 2005; Evans, 2006). La mezcla de reacción consistió en 1X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 μ M de cada cebador, agua libre de ARNasa y 2 μ l de ADNc diluido 1:10 en un volumen final de 20 μ l. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un sistema BIO-RAD CFX96™ Real-Time y el programa de ciclado consistió en una desnaturalización de 15 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C y 30 segundos a 72°C. La especificidad de la reacción se verificó analizando la curva de Melting del producto final amplificado (de 65 a 95°C, con incrementos de 0,5°C cada 0,05s). Se midió la fluorescencia durante la etapa de alargamiento. Todas las muestras se analizaron por triplicado, incluyendo en cada reacción controles negativos (sin ADN) y una curva estándar conformada por cuatro puntos de dilución a partir de una mezcla de ADNc de todas las muestras para poder calcular la eficiencia de la reacción.

Tabla 2. Lista de cebadores usados en este trabajo.

Cebadores	Forward Primer (5' to 3')	Reverse Primer (5' to 3')	Referencias
Proteína ribosómica S5 (RPS5)	5'-AATTATTTGGTGCCTGGAATTG-3'	5'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-3'	Evans, 2006
Beta actina (β -actin)	5'-ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG-3'	5'-GACCCACCAATCCATACGGA-3'	Yang & Cox-Foster, 2005

Himenoptecina (HYM)	5'-ATATCCCGACTCGTTTCCGA-3'	5'-TCCCAAACCTCGAATCCTGCA-3'	Yang & Cox-Foster, 2005
Glucosa oxidasa (GOX)	5'-GAGCGAGGTTTCGAATTGGA-3'	5'-GTCGTTCCCCCGAGATTCTT-3'	Yang & Cox-Foster, 2005
Lisozima (LYS)	5'-ACACGGTTGGTCACTGGTCC-3'	5'-GTCCCACGCTTTGAATCCCT-3'	Yang & Cox-Foster, 2005
Vitelogenina (VG)	5'-AGTTCCGACCGACGACGA-3'	5'-TTCCCTCCCACGGAGTCC-3'	Corona <i>et al</i> , 2007
Profenoloxidasa (PPO)	5'-TAATTGCGAACGGCTATGTAATCGTCT-3'	5'-ACTGGCAACAAGGGAATCTAATTTCCG-3'	Corona M., comunicación personal, publicado en Castelli <i>et al</i> , 2021
Virus de las alas deformes (DWV)	5'-ACCGACAAGGGTATGATGC-3'	5'-CTTGAGTTTGCGGTGTTCCT-3'	Kukielka <i>et al</i> , 2018

6.6. Análisis de la comunidad microbiana intestinal

6.6.1. Extracción de ADN de abejas melíferas

Se muestrearon diez abejas de 7 días (tres/cuatro abejas por jaula) sometidas a diferentes tratamientos (i, ii, iii y v). Las abejas se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito al 1% y se extrajeron individualmente los intestinos con pinzas estériles (Engel *et al*, 2013). Cada intestino fue homogeneizado en 500 μ l de PBS esteril utilizando una varilla de vidrio y almacenado a -20°C. Para la extracción de ADN intestinal de las abejas de manera individual se siguió el método propuesto por Zhou y colaboradores (1996). Los intestinos individuales homogeneizados previamente fueron colocados en tubos de lisis con 800 μ l de buffer de extracción. Luego estos tubos se homogeneizaron a una velocidad de 4,0 m/s durante 40 segundos en un equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA) y se centrifugaron a 7881 rpm por 1 minuto. Los sobrenadantes obtenidos (1 ml/tubo) fueron transferidos a tubos eppendorf de 2 ml estériles, se les agregó el mismo volumen (1 ml) de Cloroformo: alcohol-isoamílico (24:1) y se homogeneizaron suavemente. Posteriormente, se centrifugó a 13.375 rpm durante 10 minutos, se recolectó la fase acuosa (fase superior siendo aproximadamente 750 μ l) y se transfirió a tubos eppendorf de 2 ml estériles. A continuación, todos los pasos a partir del agregado de Cloroformo: alcohol-isoamílico (24:1) se repitieron dos veces. Posteriormente, se precipitó el ADN con 0,6 volúmenes de Isopropanol frío, se homogeneizó moderadamente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se centrifugó a 13.375 rpm por 40 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se lavó el pellet con 200 μ l de Etanol 70% frío. Nuevamente se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar el pellet durante 15-30 minutos aproximadamente a

temperatura ambiente, dejando los tubos semi-invertidos con tapa abierta. Luego se resuspendió cada pellet con 200 μ l de agua ultrapura y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los tubos se incubaron a 37°C en agitación por 30 minutos. Finalmente, el ADN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific™) y las concentraciones se normalizaron a 10 ng/ μ l. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su envío al centro de secuenciación.

6.6.2. Secuenciación de amplicones de ARNr 16S

Las muestras de ADN obtenidas se enviaron a MacroGen (Seúl, Corea) para la preparación de la biblioteca y la secuenciación de amplicones de ARNr 16S, como se describe en la guía de preparación de Illumina (para obtener más detalles, consultar en: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf, consultado el 31 de julio de 2020). Las bibliotecas de secuenciación se construyeron utilizando una estrategia de PCR de dos pasos. La región V3-V4 del gen de ARNr 16S se amplificó utilizando los cebadores Bakt_341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y Bakt_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') con adaptadores voladizos conectados y 25 ciclos de amplificación. Luego, se realizó una segunda PCR para unir índices duales y adaptadores de secuenciación usando el Nextera XT Index Kit. La secuenciación se llevó a cabo usando Illumina MiSeq 2x300bp.

6.7. Cuantificación de esporas del microsporidio *Nosema ceranae*

Se tomaron muestras de quince abejas recién emergidas (T_0) y se recolectaron quince abejas de cada grupo (cinco por jaula) para determinar el nivel de infección por *Nosema ceranae* a tiempo 7 y 14 días post infección. Se extrajeron los intestinos medios, se homogeneizaron individualmente en 1 ml de agua destilada y se cuantificó el número de esporas/abeja mediante el uso de un hemocitómetro (Fries *et al.*, 2013; Human *et al.*, 2013).

6.8. Análisis estadísticos

6.8.1. Análisis de expresión de genes y cuantificación de DWV

La cuantificación de la expresión génica se analizó con el método descrito por Pfaffl (2001), utilizando las abejas recién emergidas (tiempo cero) como grupo calibrador. Para identificar el gen de referencia óptimo, utilizamos RefFinder, una herramienta basada en la web que proporciona una evaluación de clasificación completa con algoritmos computacionales (método geNorm, Bestkeeper y Delta-Ct) (Xie *et al.*, 2012). En base a esos resultados, se seleccionó la proteína ribosómica S5 (RPS5) para la normalización (Evans, 2006). Los datos de cada gen se analizaron en el software RStudio versión 4.0.2 (RStudio Team, 2020) para determinar si se ajustaban a una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y varianza

homogénea (prueba de Levene). Dependiendo de la naturaleza de los datos, se realizaron pruebas paramétricas (ANOVA) o no paramétricas (Kruskall-Wallis).

6.8.2. Análisis de la microbiota intestinal

El estudio de la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas fue abordado mediante la evaluación de la alfa y la beta diversidad. La alfa diversidad fue aplicada para analizar la complejidad de la diversidad de especies dentro de una misma muestra utilizando distintos índices. Por su parte, la beta diversidad fue utilizada para evaluar las diferencias en la complejidad de especies presentes entre muestras (Mani *et al.*, 2020).

El análisis de la microbiota intestinal se llevó a cabo utilizando los programas QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019) y R Studio versión 4.0.2 (RStudio Team, 2020). Las lecturas se analizaron mediante el algoritmo de reducción de ruido de amplicón divisivo 2 (DADA2, Callahan *et al.*, 2016) en QIIME 2. Las lecturas sin procesar de baja calidad se descartaron y las secuencias de los cebadores se eliminaron utilizando cutadapt (Martin, 2011). Las lecturas se recortaron en los primeros 15 pb para las secuencias forward y 10 pb para las secuencias reverse y se truncaron a 260 pb para las secuencias forward y 250 pb para las secuencias reverse. Posteriormente, se filtraron en función de la longitud, se obtuvieron secuencias representativas y se eliminaron las lecturas quiméricas y los ruidos. Luego, la asignación taxonómica de las variantes de secuencia de amplicón (ASV) se realizó utilizando la base de datos SILVA_132 por assignTaxonomy. Adicionalmente, las lecturas relativas a cloroplastos, mitocondrias y eucariotas se excluyeron de los análisis posteriores (paquete "phyloseq" versión 1.28.0 (McMurdie *et al.*, 2013), función "subset_taxa"). Para mejorar la visualización de los gráficos de barras (abundancia relativa de ASV), solo se conservaron aquellos ASV que tenían al menos 1% de abundancia relativa en un mínimo de 2 muestras (paquete "genefilter" versión 1.66.0 (Gentleman *et al.*, 2019), función "filterfun_sample"). Por otra parte, la diversidad alfa y beta se calculó utilizando el paquete "Vegan" (Oksanen, 2019) con la tabla de ASV completa. La diversidad alfa se evaluó utilizando los índices de Shannon y ASV observados. En el caso de la diversidad beta, utilizamos índices de Bray-Curtis, UniFrac ponderado (para la abundancia relativa de ASV) y UniFrac no ponderado (presencia/ausencia de ASV) (función "vegdist") (Anderson, 2006). Además, utilizando datos de diversidad beta, realizamos un análisis de varianza multivariante permutacional (ADONIS, función "adonis") para probar el efecto de diferentes tratamientos en la estructura de la comunidad. Luego, para probar la homogeneidad de las dispersiones multivariadas (Anderson, 2006; Anderson *et al.*, 2006) usamos la función "betadisper" y para comparar las distancias de las muestras individuales a los centroides del grupo en el espacio multidimensional usamos "permutest". Por otra parte, se utilizó el software DESeq2 (Love *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2018) para poder analizar las diferencias en la abundancia relativa de los ASVs entre diferentes grupos.

6.8.3. Análisis de la supervivencia de las abejas

El efecto del imidacloprid y la infección por *N. ceranae* sobre la supervivencia de las abejas se determinaron mediante el método de Kaplan-Meier y las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba Log-Rank. Además, para evaluar el riesgo de muerte de las abejas según los diferentes tratamientos se utilizó el modelo de Cox (Kleinbaum & Klein, 2012).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software RStudio versión 4.0.2 (RStudio Team, 2020) y los valores de p por debajo de 0,05 se consideraron significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto del imidacloprid y/o *N. ceranae* sobre genes vinculados a la inmunidad de las abejas

La exposición crónica durante siete días a una dosis subletal de imidacloprid (0,001 μg /abeja) disminuyó el nivel de expresión relativa del gen que codifica para la himenoptaecina (prueba KW, $p < 0,001$; prueba MW de imidacloprid vs grupo control, $p = 0,001$, Fig. 21A). Por otro lado, el imidacloprid tendió a aumentar el nivel de expresión génica de la lisozima (prueba ANOVA, $p = 0,044$; prueba de Scheffé imidacloprid vs grupo control, $p = 0,08$, Fig. 21B). Sin embargo, no se evidenció un efecto del insecticida sobre el nivel de expresión génica de la vitelogenina, la glucosa oxidasa y la profenoloxidasa ($p \geq 0,05$ en todos los casos) (Fig. 21).

En cuanto a la infección por *N. ceranae*, el microsporidio disminuyó el nivel de expresión del gen que codifica para la vitelogenina (prueba ANOVA, $p = 0,001$; *N. ceranae* vs control Scheffé test $p = 0,002$, Fig. 21C). Finalmente, observamos que las abejas de 7 días mostraron niveles de expresión genica para la himenoptaecina, glucosa oxidasa y vitelogenina más altos en comparación con las abejas recién emergidas (T_0), pero fue independiente de los tratamientos (Fig. 21)

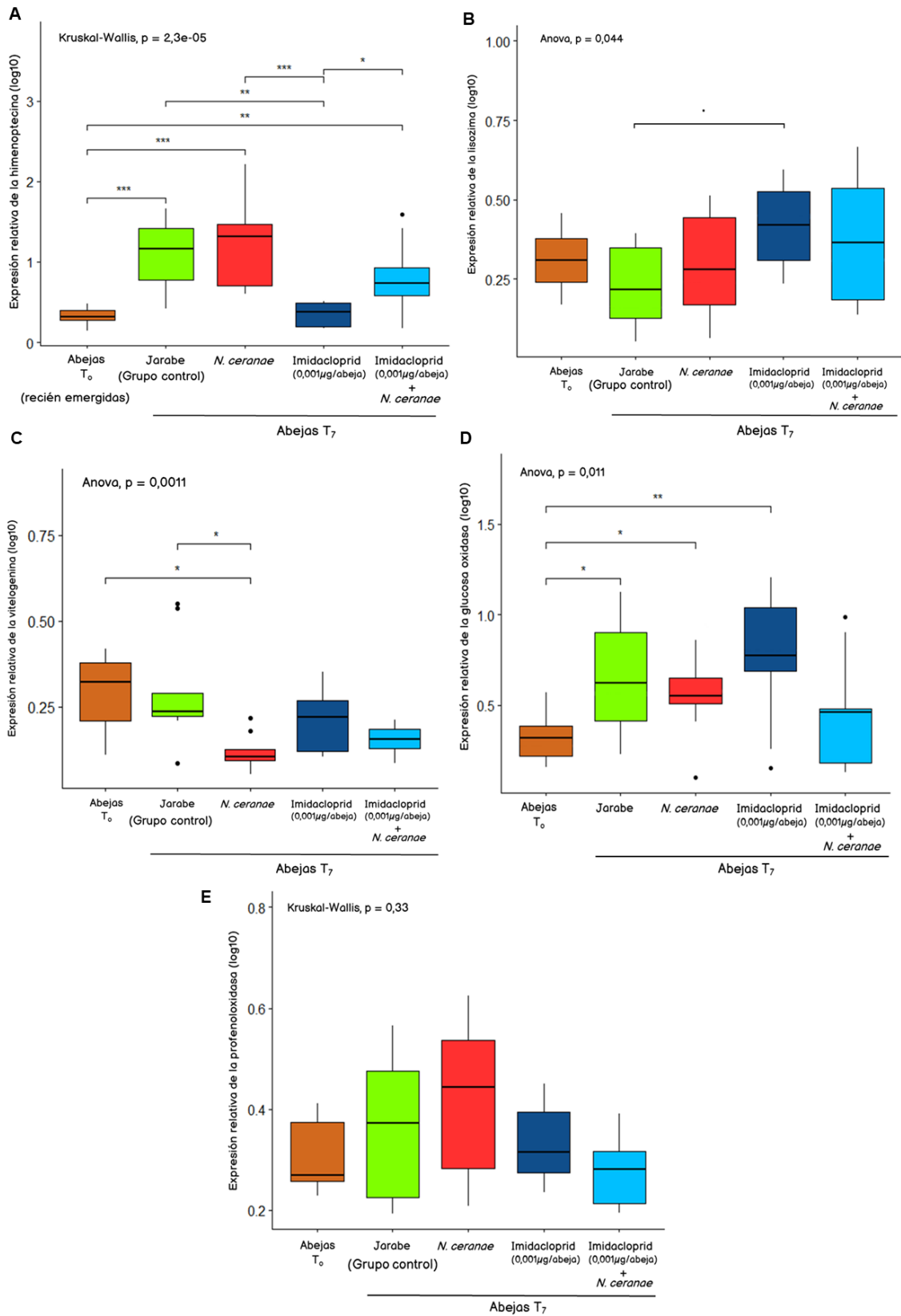


Figura 21. Expresión relativa de himenoptecina (A), lisozima (B), vitelogenina (C), glucosa oxidasa (D) y profenoloxidasa (E) en abejas melíferas recién emergidas intoxicadas con imidacloprid (0,001 mg/abeja) y/o infectadas por *N. ceranae*. La cuantificación de la expresión génica y el nivel de infección por DWV se llevaron a cabo mediante qPCR. Se utilizaron diez abejas individuales/tratamiento. Las diferencias significativas con la prueba de Mann-Whitney (A y E) o la prueba de Scheffé (B, C y D) se indican con asteriscos ($p \leq 0,1$, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ y $***p \leq 0,001$).

7.2. Efecto del imidacloprid y/o *N. ceranae* sobre el nivel de infección con DWV

Las abejas melíferas empleadas en el ensayo estaban naturalmente infectadas con DWV, ya que se evidenciaron niveles bajos de este virus en las abejas recién emergidas y en el grupo control a diferentes tiempos (Fig. 22A). La infección por el microsporidio *N. ceranae* solo o en combinación con imidacloprid 0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ aumentó el nivel de infección por DWV en comparación con el grupo control (prueba KW, $p=0,00011$; prueba MW, $p=0,01$ y $p=0,0003$, respectivamente). El imidacloprid con respecto al grupo control no afectó este parámetro (prueba MW, $p=0,40$).

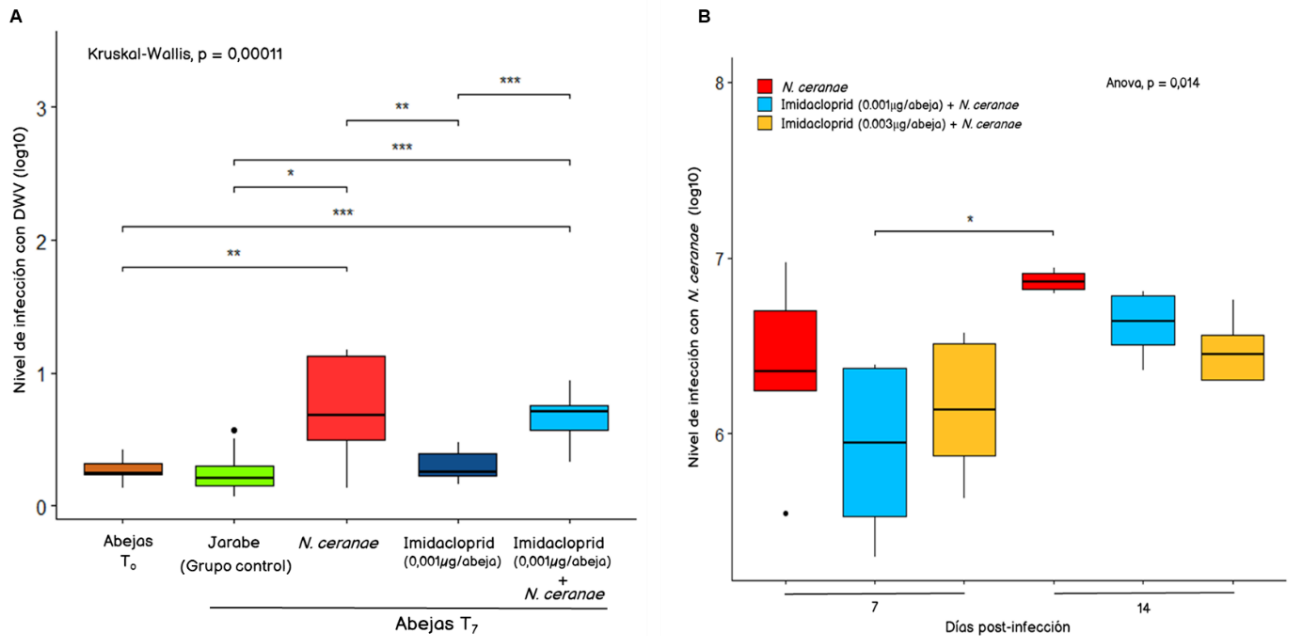


Figura 22. Nivel de infección de DWV en abejas melíferas recién emergidas expuestas a imidacloprid (0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$) e infectadas por *N. ceranae* (A). La cuantificación de la expresión génica del nivel de infección por DWV fue llevado a cabo mediante qPCR. Se utilizaron diez abejas individuales por tratamiento. Número de esporas de *N. ceranae* por abeja, en abejas melíferas expuestas a dosis subletales de imidacloprid (0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ y 0,003 $\mu\text{g}/\text{abeja}$) (B). El número de esporas se determinó los días 7 y 14 en quince abejas por grupo. Las diferencias significativas con la prueba de Mann-Whitney (A) y la prueba de Scheffé (B) se indican con asteriscos (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$).

Por otro lado, las abejas melíferas no se infectaron de forma natural con *N. ceranae*, ya que no se detectaron esporas en abejas no infectadas artificialmente (imidacloprid 0,0001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ y 0,003 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ y grupo control a los 7 y 14 días). En abejas infectadas artificialmente, el número de esporas siempre fue alto independientemente del tratamiento (Fig. 22B). No se observaron diferencias en la multiplicación de esporas a lo largo del tiempo en abejas infectadas con *N. ceranae* o infectadas e intoxicadas con la dosis de 0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ o 0,003 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ (prueba ANOVA, $p=0,014$; prueba de Scheffé $p \geq 0,05$ en todas las comparaciones por pares excepto para imidacloprid 0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ + *N. ceranae* 7 días vs *N. ceranae* 14 días).

Por otro lado, se determinó que la única especie de microsporidio presente en la suspensión de esporas utilizada para infectar a las abejas fue *Nosema ceranae* (Fig. 23). Las abejas empleadas no estaban naturalmente infectadas con *N. ceranae*, ya que no se detectaron esporas en aquellas abejas que no fueron infectadas artificialmente (tiempo cero (T₀) y grupos imidacloprid 0,001 μ g/abeja, imidacloprid 0,003 μ g/abeja y control a los 7 y 14 días).

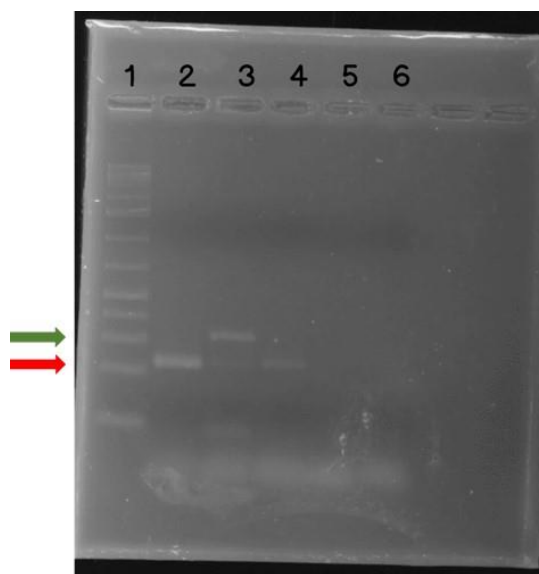


Figura 23. Imagen representativa de gel de agarosa con los productos de amplificación por multiplex PCR del fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S de *N. ceranae* y *N. apis* utilizando cebadores específicos para estos microsporidios. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 218 pb (flecha roja) y el de *N. apis* en 321 pb (flecha verde). Carril 1: marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb Plus, Thermo); Carril 2: Muestra problema, Carril 3: control positivo *N. apis*, Carril 4: control positivo *N. ceranae*, Carril 5 y 6: Controles negativos.

7.3. Efecto del imidacloprid y/o *N. ceranae* sobre la microbiota intestinal

El impacto del imidacloprid solo o combinado con *N. ceranae* sobre la composición y estructura de la microbiota intestinal de la abeja se evaluó mediante secuenciación de amplicones de ARNr 16S. De las 40 muestras analizadas, 4 no pudieron ser secuenciadas y fueron excluidas del análisis (1 muestra del grupo control y 3 muestras del grupo expuesto a imidacloprid 0,001 μ g/abeja + *N. ceranae*). Obtuvimos 4,936,043 lecturas (promedio por muestra 137,000, mínimo 85,683 y máximo 160,499), y se identificaron 248 variantes de secuencia de amplicones (ASVs). Las curvas de rarefacción respaldaron una cobertura suficiente para todas las muestras, lo que indica que nuestro esfuerzo de muestreo ha capturado la mayor parte de la diversidad de las comunidades bacterianas (Fig. 24).

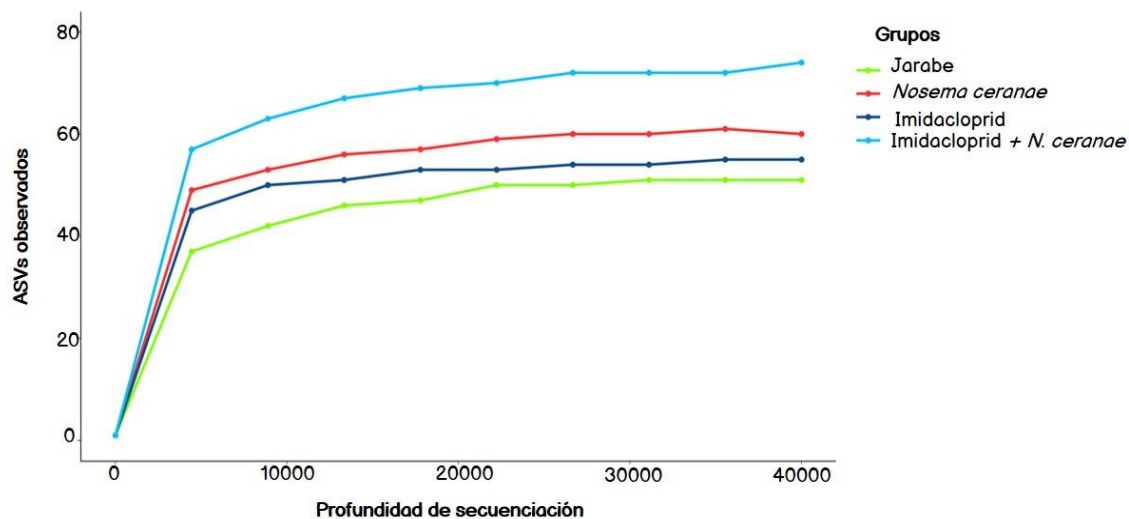


Figura 24. Curvas de rarefacción observadas de ASV de comunidades bacterianas de diferentes tratamientos; jarabe (verde), *N. ceranae* (rojo), imidacloprid (azul) e imidacloprid + *N. ceranae* (celeste).

A nivel de la alfa diversidad, en el índice ASVs observados se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos (prueba ANOVA, $p=0,0028$, Fig. 25). La combinación de imidacloprid con *N. ceranae* aumentó este parámetro en comparación con el grupo control (prueba ANOVA, $p=0,003$, $p=0,029$; prueba Scheffé, $p=0,021$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el índice de Shannon entre los tratamientos (prueba ANOVA, $p=0,18$) (Fig. 25).

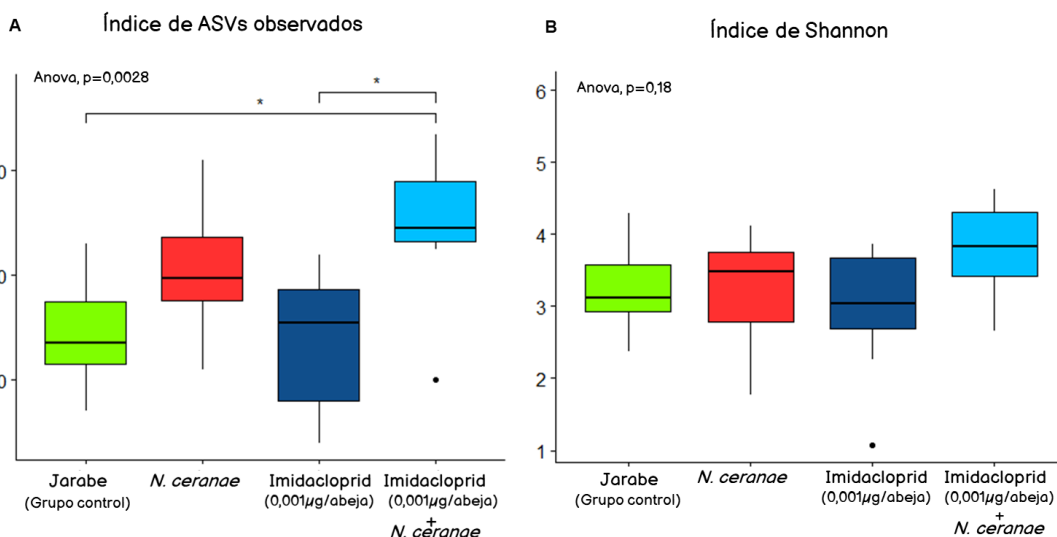


Figura 25. Impacto de la exposición crónica al imidacloprid (dosis 1 = 0,001 µg/abeja), infección por *N. ceranae* (100.000 esporas/abeja en el día 0) y ambos factores combinados en la microbiota intestinal de la abeja melífera después de siete días: índice de ASVs observados (A) y el índice de Shannon (B). Se analizaron individualmente diez abejas melíferas por grupo. Los resultados se muestran como diagramas de caja, que incluyen la mediana, los cuartiles de 25 y 75% y los valores atípicos. Las diferencias significativas con la prueba de Scheffé se indican con asteriscos (* $p \leq 0,05$).

Por otra parte, los índices de beta diversidad también se vieron afectadas por los tratamientos (PERMANOVA: Bray-Curtis: $p=0,001$, UniFrac ponderado: $p=0,004$, UniFrac no ponderado: $p=0,002$) (Tabla 3). La homogeneidad de las dispersiones entre los grupos, una suposición subyacente de PERMANOVA, fue confirmada por betadisper (Betadisper: Bray-Curtis: $p=0,05$, UniFrac ponderado: $p=0,56$, UniFrac no ponderado: $p=0,21$).

En las abejas melíferas sanas (no infectadas artificialmente por *N. ceranae*), el imidacloprid no afectó la beta diversidad (exceptuando el índice UniFrac no ponderado, el cual no tiene en cuenta la abundancia de los ASVs y por tanto no es tan confiable con respecto a los índices Bray-Curtis y Unifrac ponderado) (Tabla 3). Sin embargo, en las abejas infectadas, el impacto del imidacloprid fue evidente (comparaciones de PERMANOVA por pares entre los grupos de *N. ceranae* y *N. ceranae* + imidacloprid: Bray-Curtis: $p=0,037$, UniFrac ponderado: $p=0,044$, UniFrac no ponderado: $p=0,061$).

Tabla 3. Impacto de la intoxicación con imidacloprid, imidacloprid combinado con *N. ceranae*, infección por *N. ceranae* y control (jarabe) sobre la beta diversidad de la microbiota intestinal de las abejas melíferas. Se muestran los resultados de comparaciones pareadas significativas (PERMANOVA $p \leq 0,05$).

PERMANOVA	Grupo 1	Grupo 2	Tamaño de muestra	Pseudo-F	p -valor
Bray Curtis	Jarabe	<i>N. ceranae</i>	19	2,49	0,002
	Jarabe	Imidacloprid + <i>N. ceranae</i>	16	2,32	0,004
	<i>N. ceranae</i>	Imidacloprid	20	2,36	0,001
	<i>N. ceranae</i>	Imidacloprid + <i>N. ceranae</i>	17	1,64	0,037
UniFrac ponderado	Jarabe	<i>N. ceranae</i>	19	8,86	0,003
	Jarabe	Imidacloprid	20	4,32	0,024
	<i>N. ceranae</i>	Imidacloprid + <i>N. ceranae</i>	17	3,64	0,044
	<i>N. ceranae</i>	Imidacloprid + <i>N. ceranae</i>	17	1,96	0,005
UniFrac no ponderado	Jarabe	Imidacloprid	19	2,00	0,007
	Jarabe	Imidacloprid + <i>N. ceranae</i>	16	2,02	0,004
	<i>N. ceranae</i>	Imidacloprid	20	2,01	0,009
	<i>N. ceranae</i>	Imidacloprid + <i>N. ceranae</i>	17	1,52	0,061
	Imidacloprid	Imidacloprid + <i>N. ceranae</i>	17	1,97	0,013

A nivel del perfil taxónomico, en todos los grupos se observaron miembros del *core* de la microbiota intestinal como *Lactobacillus* spp., *Snodgrassella* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Gilliamella* spp., entre otras especies (Fig. 26). Además, se evidenció una alta variabilidad interindividual entre las abejas melíferas sometidas al mismo tratamiento.

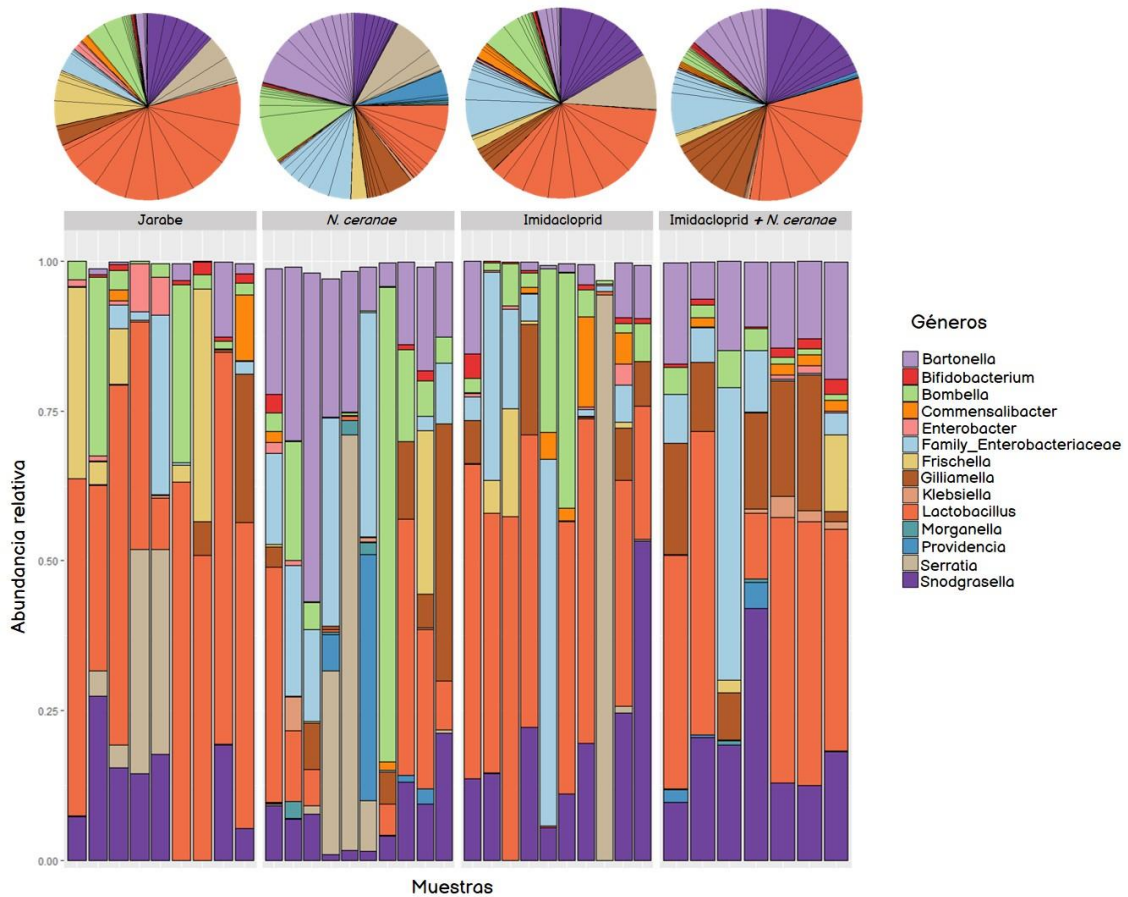


Figura 26. Abundancia relativa de diferentes géneros bacterianos en la microbiota intestinal de las abejas melíferas expuestas a una dosis subletal de imidacloprid (dosis 1 = 0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$), infectadas por *N. ceranae* y a ambos factores estresantes combinados durante 7 días. Se analizaron individualmente diez abejas melíferas por tratamiento (tres/cuatro abejas por jaula, de tres jaulas independientes). El panel superior muestra las abundancias relativas por tratamiento, mientras que el panel inferior muestra las abundancias relativas por intestino de abeja melífera, lo que ilustra la abundante variación entre las muestras dentro de los grupos.

Usando el análisis DESeq2 para identificar los miembros bacterianos afectados por nuestros tratamientos (Fig. 27), obtuvimos que ambos factores estresantes combinados (imidacloprid + *N. ceranae*) redujeron la abundancia de ASV identificados como *Streptococcus* spp. (\log_2 Fold Change 8,9; $p < 0,001$) y *Serratia* spp. (\log_2 Fold Change 13,8; $p < 0,001$), mientras que aumentó la abundancia de un ASV identificado como *Lactobacillus* spp. (\log_2 Fold Change -4,7; $p < 0,001$).

Por su parte, el microsporidio incrementó la abundancia de diferentes ASV pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae (*Providencia* spp. log2 Fold Change 41,2; *Klebsiella* spp. log2 Fold Change 27,1; *Morganella* sp. log2 Fold Change 13,2); *Fructobacillus* spp. (log2 Fold Change 6,0); *Streptococcus* spp. (log2 Fold Change 5,6); *Lactobacillus kunkeei* (log2 Fold Change 4,9) y dos ASVs identificados como *Bartonella* spp. (log2 Fold Change 4,1 y 7,7). Por otro lado, *N. ceranae* disminuyó la abundancia de dos ASV identificados como *Lactobacillus* spp. (log2 Fold Change -6,7 y -7,3). En todos los casos $p < 0,001$.

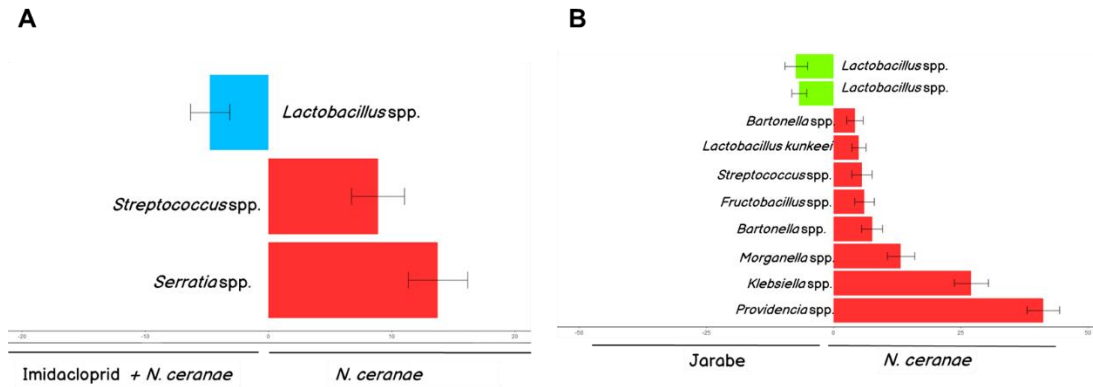


Figura 27. Impacto del imidacloprid con *N. ceranae* (A) y de *N. ceranae* (B) sobre la abundancia relativa de ASVs de la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas en comparación con el grupo control, analizadas con DESeq2. Se analizaron individualmente diez abejas melíferas por tratamiento (tres/cuatro abejas por jaula, de tres jaulas independientes).

7.4. Efecto del imidacloprid y/o *N. ceranae* en la supervivencia y Hazard ratio

La supervivencia de las abejas melíferas disminuyó significativamente en los grupos de abejas intoxicados con imidacloprid, infectados con *N. ceranae* y cuando se encontraban presentes ambos factores combinados (prueba Log-rank, $p < 0,0001$, Fig. 28A). También se observó una disminución en la mediana del tiempo de supervivencia de estos grupos en comparación con el grupo control (Tabla 4).

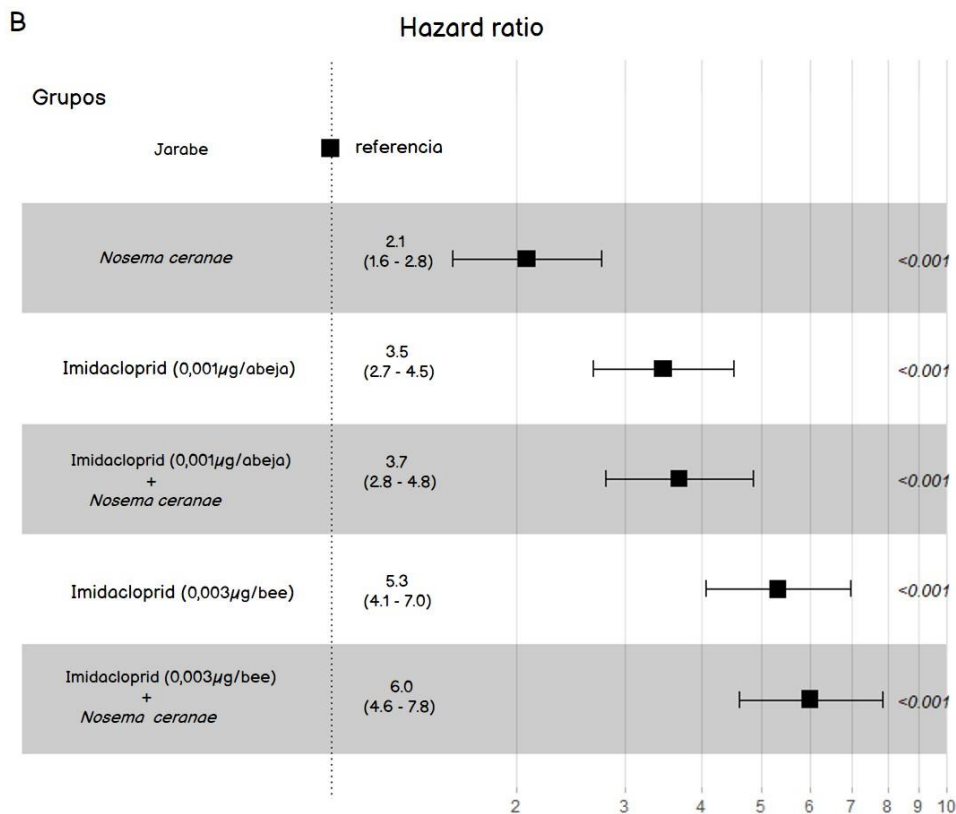
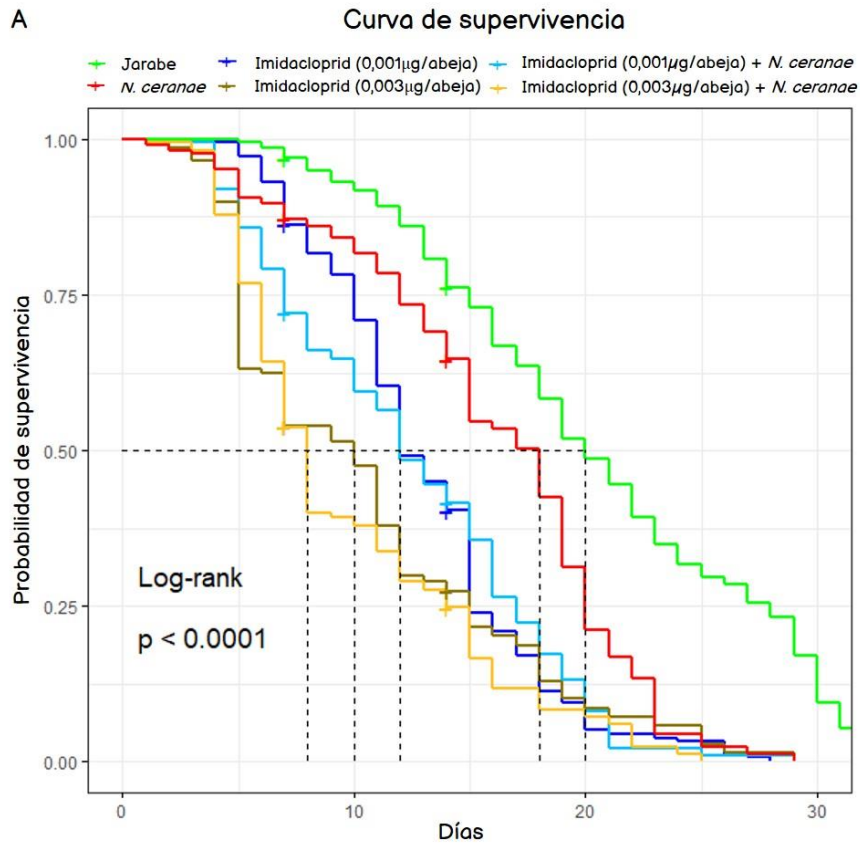


Figura 28. Impacto de la intoxicación por imidacloprid y/o la infección por *N. ceranae* sobre la supervivencia de las abejas melíferas y el Hazard Ratio. (A) Curvas de supervivencia de diferentes grupos de abejas melíferas; control (jarabe), *N. ceranae*, imidacloprid 0,001 µg/abeja, imidacloprid 0,003 µg/abeja, imidacloprid 0,001 µg/abeja + *N. ceranae*, imidacloprid 0,003 µg/abeja + *N. ceranae* y *N. ceranae*. La curva de supervivencia se

construyó mediante el método de Kaplan-Meier. Las líneas de puntos muestran la mediana del tiempo de supervivencia de cada grupo. (B) Hazard ratio (HR) del modelo de riesgos proporcionales de Cox con los datos de supervivencia. En los resultados, HR > 1 indica un mayor riesgo de muerte y HR < 1 representa un riesgo reducido. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo con la referencia (grupo de control).

Tabla 4. Mediana del tiempo de supervivencia y los límites inferior y superior del intervalo de confianza del 95% (LCI y LCS) para cada grupo en días.

Grupos	Mediana	0.95LCI	0.95UCS
Jarabe	20	18	22
<i>Nosema ceranae</i>	18	15	19
Imidacloprid (0,001µg/abeja)	12	12	14
Imidacloprid (0,001µg/abeja) + <i>N. ceranae</i>	12	11	15
Imidacloprid (0,003µg/abeja)	10	7	11
Imidacloprid (0,003µg/abeja) + <i>N. ceranae</i>	8	7	8

El modelo de regresión de Cox encontró que el Hazard ratio de todos los grupos se correlacionó con un mayor riesgo de muerte en comparación con el grupo jarabe (referencia) ($p < 0,001$, Fig. 28B). Además, las abejas que recibieron 0,001 µg/abeja de imidacloprid y/o esporas de *N. ceranae* tuvieron un aumento estadísticamente significativo de casi cuatro veces más de riesgo de muerte en comparación con el grupo control. Por otra parte, las abejas que recibieron imidacloprid 0,003 µg/abeja y/o esporas de *N. ceranae* tuvieron un aumento de 5-6 veces el riesgo de muerte en comparación con el grupo control.

7.5 Efecto del imidacloprid y/o *N. ceranae* en el consumo de jarabe

Los distintos tratamientos afectaron el consumo de jarabe de sacarosa (prueba KW, $p = 5,2e-15$, Fig. 29). Específicamente, el microsporidio *N. ceranae* por sí solo no afectó este parámetro en comparación con las abejas del grupo control (prueba MW, $p = 0,82$). En contraste, si se evidenció una menor ingesta de jarabe en las abejas intoxicadas con imidacloprid 0,001 µg/abeja o combinado con *N. ceranae* (prueba MW, $p = 0,0007$ en ambos casos). Además, se observó un impacto más fuerte en las abejas intoxicadas con la dosis 0,003 µg/abeja de imidacloprid o combinado con *N. ceranae* (prueba MW, $p = 5,7e^{-8}$, $p = 8,7e^{-10}$, respectivamente).

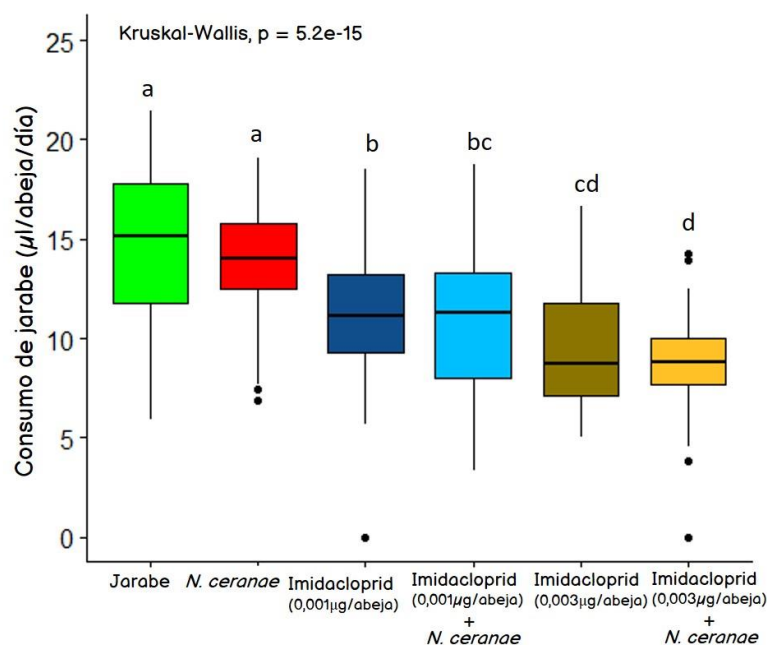


Figura 29. Consumo diario de jarabe por abeja dependiendo del grupo en los primeros 15 días del ensayo. Las gráficas de caja indican los datos mínimos y máximos, los percentiles 25 y 75 y la mediana. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p \leq 0,05$).

8. DISCUSIÓN

El uso extensivo de los neonicotinoides a nivel agrícola, su persistencia en el medio ambiente y su alta toxicidad para las abejas melíferas, hacen que estos productos sean una gran amenaza para la salud de estos insectos. De hecho, las abejas melíferas corren el riesgo de exposición crónica, a través del contacto directo o el consumo de polen, néctar o agua contaminados (Bonmatin *et al.*, 2015).

En este estudio demostramos que la exposición crónica a una dosis subletal de imidacloprid modificó la expresión de genes asociados con la inmunidad de las abejas africanizadas. En particular, esta exposición resultó en una disminución de la expresión del gen que codifica el péptido antimicrobiano himenoptecina (Casteels *et al.*, 1993), coincidiendo con estudios previos con abejas melíferas europeas (Tarek *et al.*, 2018). La reducción de la inmunocompetencia en las abejas melíferas africanizadas ya ha sido reportada por Brandt y colaboradores (2016) quienes encontraron una disminución en la densidad de hemocitos, la respuesta de encapsulación y la actividad antimicrobiana, sugiriendo un deterioro de la

capacidad de resistencia a enfermedades. Sin embargo, en nuestro estudio, la reducción de la inmunocompetencia no favoreció la infección por DWV o *N. ceranae*.

Por otro lado, el imidacloprid tendió a aumentar la expresión génica de la lisozima, responsable de hidrolizar las paredes celulares y promover la síntesis de péptidos antimicrobianos (Schneider, 1985), coincidiendo también con estudios previos en abejas melíferas europeas (Tarek *et al*, 2018). En un ensayo similar, el glifosato también aumentó la expresión de este gen, lo que sugiere que puede ser una respuesta fisiológica para mitigar los efectos negativos del envenenamiento (Castelli *et al*, 2021b).

A su vez, no encontramos una expresión diferencial de glucosa oxidasa, profenoloxidasa o vitelogenina asociada con imidacloprid o imidacloprid con *N. ceranae*, como se observó en estudios previos (Brandt *et al*, 2016; Tarek *et al*, 2018; Li *et al*, 2017) sin embargo no podemos descartar esta posibilidad. La expresión podría estar enmascarada por el análisis de todo el cuerpo de la abeja melífera en lugar de usar tejidos específicos, o podría estar asociada con diferentes dosis y tiempos de exposición. De todos modos, nuestros resultados sugieren que la exposición a imidacloprid genera un estado inmunológico alterado en las abejas melíferas.

En cuanto al microsporidio *N. ceranae*, evidenciamos que redujo significativamente los niveles de transcripción de la vitelogenina, coincidiendo con estudios previos (Antúnez *et al*, 2009; Goblirsch *et al*, 2013). Según el trabajo realizado por Paris y colaboradores (2018), esto podría explicar en parte por qué la supervivencia de las abejas melíferas disminuye cuando son infectadas por *N. ceranae*. Por otra parte, la expresión del gen que codifica para la enzima lisozima en abejas infectadas no se vió afectada, lo cual es consistente con el trabajo de Antúnez y colaboradores (2009). Además, la infección con *N. ceranae* aumentó el nivel de infección por DWV, lo que podría implicar un efecto sinérgico entre ellos. Zheng y colaboradores (2015) sugirieron que este posible sinergismo depende de la dosis y la nutrición. Observaron que cuando se restringió el polen de las abejas melíferas y se inocularon con 1×10^4 o con 1×10^5 esporas de *N. ceranae*/abeja, similar a lo realizado en este trabajo, podría ocasionar un aumento significativo en los títulos de DWV.

A nivel de la comunidad microbiana intestinal observamos una alta variabilidad entre individuos, cada abeja melífera presenta un perfil de microbiota diferente lo cual es consistente

con estudios previos (Moran *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 2014; Ellegaard & Engel, 2019). Dicha variación podría estar dada por la dieta, la edad, el estado de salud o las diferencias fisiológicas a corto plazo de los individuos (Moran *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020). Además, en otros insectos, se han observado diferencias en la comunidad microbiana intestinal dependiendo de si el estudio fue realizado a nivel de campo o en condiciones de laboratorio (Xiang *et al.*, 2006; Staubach *et al.*, 2013). Todos estos hallazgos pueden conducir a una desviación sustancial de la composición característica de la microbiota intestinal individual. De hecho, en este estudio se observó la presencia de bacterias ambientales oportunistas de la familia Enterobacteriaceae (por ejemplo especies dentro de los géneros *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp.), lo cual coincide con publicaciones previas (Mattila *et al.*, 2012; Moran *et al.*, 2012; Corby-Harris *et al.*, 2014a).

Varias otras bacterias, incluidas *Frischella* spp., *Bartonella* spp., *Commensalibacter* spp. y *Bombella* spp., fueron prevalentes en todos los tratamientos, pero no necesariamente presentes en todas las abejas, como se informó anteriormente (Kwong & Moran, 2016). En particular, se detectó *Bartonella* spp. en todas las abejas infectadas por *N. ceranae*, de acuerdo con trabajos anteriores (Castelli *et al.*, 2021b; Panjad *et al.*, 2021).

La exposición al imidacloprid durante siete días no afectó la microbiota intestinal de las abejas melíferas africanizadas, como ya informaron Raymann y colaboradores (2018) para las abejas melíferas europeas. Sin embargo, cuando las abejas fueron infectadas por *N. ceranae*, se observaron cambios significativos, evidenciando un efecto combinado entre ambos estresores. En particular, observamos una disminución en la abundancia de ASV identificados como *Streptococcus* spp. y *Serratia* spp. y una mayor abundancia de un ASV identificado como *Lactobacillus* spp. Por lo tanto, no podemos descartar un mayor efecto del imidacloprid si la exposición se prolonga en el tiempo, tal y como informan Rouzé y colaboradores (2019). En el caso de *N. ceranae* evidenciamos un aumento de la abundancia de ASVs identificados como *Bartonella* spp., lo cual coincide con trabajos previamente publicados (Castelli *et al.*, 2020; Panjad *et al.*, 2021). Además, el microsporidio aumentó la abundancia de ASVs pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae como *Klebsiella* spp., *Morganella* spp. y *Providencia* spp. y disminuyó la abundancia de ASVs identificados como *Lactobacillus* spp.. Estas alteraciones

pueden explicarse por el extenso daño causado por *N. ceranae* al ingresar a las células epiteliales para reproducirse, afectando el metabolismo y la fisiología de las abejas melíferas y deprimiendo la respuesta inmune (Antúnez *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2010). Las alteraciones asociadas con *N. ceranae* probablemente se vieron exacerbadas por el uso de jarabe de sacarosa para alimentar a las abejas, en lugar de jarabe y polen, como informaron Huang y colaboradores (2018).

Finalmente, la exposición crónica al imidacloprid combinada con *N. ceranae* fue tóxica para las abejas melíferas incluso en dosis subletales, lo que coincide con los hallazgos informados por Alaux y colaboradores (2010a). Además, se observó un efecto dosis, ya que las abejas melíferas expuestas a la concentración de 0,003 $\mu\text{g}/\text{abeja}$, tuvieron una tasa de mortalidad más alta en comparación con las intoxicadas con la concentración de 0,001 $\mu\text{g}/\text{abeja}$. Adicionalmente, el Hazard ratio asociado a cada grupo es mayor en comparación con la referencia (grupo control jarabe), lo cual indica una fuerte relación entre el tratamiento que recibieron las abejas con un mayor riesgo de muerte. Por ejemplo, el grupo infectado por *N. ceranae* tiene el doble de riesgo de muerte, ya que las abejas melíferas de este grupo aumentan el riesgo de muerte en un factor de 2,1 o equivalentemente a un 210% con respecto al grupo control.

Por otra parte, el consumo de jarabe se vió afectado por el tratamiento, ya que las abejas melíferas expuestas al imidacloprid consumieron menor cantidad de jarabe con respecto a las abejas del grupo control. Decourtye y colaboradores (2004) también encontraron que la adición de imidacloprid en los alimentos disminuyó el consumo de jarabe debido a un efecto anti alimentario o repelente. Además, el imidacloprid produjo un déficit en el aprendizaje olfativo y la actividad de búsqueda de alimento en condiciones de laboratorio y semi-campo (Decourtye *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2004; Imran *et al.*, 2019). Sin embargo, en nuestro estudio, el consumo de sacarosa debería ser suficiente para que las abejas no se mueran ya que las abejas necesitan 4 mg de azúcar utilizable por día para sobrevivir (alrededor de 8 ul de solución de sacarosa al 50% por abeja por día) (Barker *et al.*, 1974). Esta estimación sugiere que la muerte de las abejas no estuvo asociada con una posible inanición en la mayoría de los casos.

En resumen, nuestros hallazgos muestran que la exposición crónica de las abejas melíferas a una dosis subletal de imidacloprid altera la expresión de genes asociados con la inmunidad, generando un estado inmunológico alterado. El imidacloprid en combinación con los microsporidios *N. ceranae* también alteró la microbiota intestinal de las abejas melíferas. Sin embargo, las interacciones parecen ser aditivas en lugar de sinérgicas. Esos impactos negativos en la salud de las abejas se evidenciaron por las altas tasas de mortalidad de las abejas. Estos resultados ilustran los efectos de imidacloprid y *N. ceranae* en las abejas melíferas africanizadas y contribuyen a visualizar el alcance del impacto de esos factores estresantes en los polinizadores.

9. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo fueron las siguientes:

- 1) La intoxicación crónica con dosis subletales de imidacloprid afectó la expresión de genes del sistema inmune de las abejas (himenoptecina y lisozima), sin embargo no afectó el nivel de infección por los patógenos DWV y *N. ceranae*. En presencia de *N. ceranae* sí favoreció a la multiplicación del virus DWV.
- 2) El imidacloprid no afectó la comunidad de la microbiota intestinal de las abejas melíferas africanizadas. Sin embargo, cuando las abejas se encuentran al mismo tiempo infectadas con *N. ceranae* sí se evidenciaron cambios en la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas (alfa y beta diversidad y en la abundancia de ASVs).
- 3) El microsporidio *N. ceranae* afectó la fisiología de las abejas melíferas africanizadas (vitelogenina), la microbiota intestinal (beta diversidad y la abundancia de ASVs) y favoreció la multiplicación del virus DWV.
- 4) El consumo de jarabe disminuyó en las abejas melíferas africanizadas intoxicadas con el insecticida, pudiendo deberse a un efecto anti-consumo ocasionado por el mismo,

así como por posibles lesiones neurológicas en las abejas, las cuales generan problemas en la olfacción. A pesar de esto, el consumo de jarabe fue suficiente para que las abejas sobrevivieran.

- 5) El imidacloprid aún en dosis subletales ocasionó altas mortalidades, con y sin presencia del microsporidio *N. ceranae*. Evidenciamos una marcada disminución en la tasa de supervivencia de las abejas así como un aumento en el nivel de riesgo a muerte.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Shaara, H. F. (2012). Notes on water collection by honey bees. *Bee World*, 89(4), 86-87.

Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P., & Le Conte, Y. V. (2010a). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12(3), 774-782.

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010b). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology letters*, 6(4), 562-565.

Albo, G. N., Cordoba, S. B., & Reynaldi, F. J. (2017). Chalkbrood: pathogenesis and the interaction with honeybee defenses. *Int. J. Envir. Agric. Res*, 3(1), 71-80.

Allen, M., & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee world*, 77(3), 141-162.

Alatawy, M., Al-Attas, S. G., Assagaf, A. I., Al-Shehri, A., Alghamdi, K. M., & Bahieldin, A. (2020). Gut microbial communities of adult honey bee workers (*Apis mellifera*). *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 17(2), 353-362.

Alger, S. A., Burnham, P. A., Lamas, Z. S., Brody, A. K., & Richardson, L. L. (2018). Home sick: Impacts of migratory beekeeping on honey bee (*Apis mellifera*) pests, pathogens, and colony size. *PeerJ*, 6, e5812.

Amdam, G. V., Simões, Z. L., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., ... & Omholt, S. W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental gerontology*, 39(5), 767-773.

Anadón, A., Ares, I., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M. R., & Martínez, M. A. (2020). Neurotoxicity of Neonicotinoids. In *Advances in Neurotoxicology* (Vol. 4, pp. 167-207). Academic Press.

Anderson, R. M., & May, R. M. (1986). The invasion, persistence and spread of infectious diseases within animal and plant communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 314(1167), 533-570.

Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & applied acarology*, 24(3), 165-189.

- Anderson, M. J. (2006). Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics*, *62*(1), 245-253.
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., & McArdle, B. H. (2006). Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecology letters*, *9*(6), 683-693.
- Anderson, K. E., Rodrigues, P. A., Mott, B. M., Maes, P., & Corby-Harris, V. (2016). Ecological succession in the honey bee gut: shift in *Lactobacillus* strain dominance during early adult development. *Microbial ecology*, *71*(4), 1008-1019.
- Anderson, K. E., & Ricigliano, V. A. (2017). Honey bee gut dysbiosis: a novel context of disease ecology. *Current opinion in insect science*, *22*, 125-132.
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P. & Antúnez, K. (2015). Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, *54*(5), 532-540.
- Annoscia D, Del Piccolo F, & Nazzi F (2012) How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of Insect Physiology*, *58*(12),1548-55.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., & Zunino, P. (2005). Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *90*(1), 69-72.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., & Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of invertebrate pathology*, *93*(1), 67-70.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, *11*(9), 2284–2290.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., ... & Zunino, P. (2015). Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial ecology*, *70*(2), 522-533.
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., & Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, *48*(3), 364-370.
- Aronstein, K. A., Saldívar, E., Vega, R., Westmiller, S., & Douglas, A. E. (2012). How *Varroa* Parasitism Affects the Immunological and Nutritional Status of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, *3*(3), 601-615.
- Aktar, M.W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, *2*(1), 1–12.
- Bailey, L., & Gibbs, J. (1964). Acute infection of bees with paralysis virus. *Journal of insect pathology*, *6*(4), 395-407.
- Bailey, L. (1976). Viruses attacking the honey bee. In *Advances in virus research* (Vol. 20, pp. 271-304). Academic Press.
- Bailey, L. & Ball, B.V. (1991) Honey bee pathology. London: Acad. Press.
- Bailey, L. (1999). The quest for a super-bee. *Bee World*, *80*(2), 55-60.

- Ball, V., & Allen, M. F. (1988). The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Annals of Applied Biology*, 113(2), 237-244.
- Barker, R. J., & Lehner, Y. (1974). Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Zoology*, 187(2), 277-285.
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J.R. & Dalmon, A. (2020) Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 11, 239.
- Belsky, J., & Joshi, N. K. (2019). Impact of biotic and abiotic stressors on managed and feral bees. *Insects*, 10(8), 233.
- Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.
- Boina, D. R., Onagbola, E. O., Salyani, M., & Stelinski, L. L. (2009). Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(8), 870-877.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Boman, H. G., & Hultmark, D. (1987). Cell-free immunity in insects. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 103-126.
- Boncristiani, H., Ellis, J. D., Bustamante, T., Graham, J., Jack, C., Kimmel, C. B., ... & Schmehl, D. R. (2020). World Honey Bee Health: The Global Distribution of Western Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Pests and Pathogens. *Bee World*, 1-5.
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., ... & Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental science and pollution research*, 22(1), 35-67.
- Bortolotti, L., Montanari, R., Marcelino, J., Medrzycki, P., Maini, S., & Porrini, C. (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 56, 63-68.
- Bovi, T. S., Zaluski, R., & Orsi, R. O. (2018). Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1), 239-245.
- Branchiccela, B., Aguirre, C., Parra, G., Estay, P., Zunino, P., & Antúnez, K. (2014). Genetic changes in *Apis mellifera* after 40 years of Africanization. *Apidologie*, 45(6), 752-756.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology*, 86, 40-47.
- Breeze, T.D., Bailey, A.P., Balcombe, K.G., & Potts, S.G. (2011). Pollination services in the UK: How important are honeybees?. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 142(3-4), 137– 143.
- Brodtschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294.

- Brosi, B. J., Delaplane, K. S., Boots, M., & de Roode, J. C. (2017). Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. *Nature ecology & evolution*, 1(9), 1250-1262.
- Burges, H. D., Canning, E. U., & Hulls, I. K. (1974). Ultrastructure of *Nosema oryzaeophili* and the taxonomic value of the polar filament. *Journal of Invertebrate Pathology*, 23(2), 135-139
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Cali, A. & Becnel, J. & Takvorian, P. (2017). *Microsporidia*. En *Handbook of the Protists: Second Edition* (pp. 1559-1618). Springer International Publishing.
- Canciani, M., Arnellos, A., & Moreno, A. (2019). Revising the superorganism: an organizational approach to complex eusociality. *Frontiers in Psychology*, 10, 2653.
- Carreck, N., & Williams, I. (1998). The economic value of bees in the UK. *Bee world*, 79(3), 115-123.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO journal*, 8(8), 2387-2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Rivière, L., Damme, J.V., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., & Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *The FEBS Journal*, 187(2), 381-386.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044-7054.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569-28575.
- Castelli Norando, L. (2016). Tesis de grado: Una aproximación al estudio de la comunidad microbiana de las abejas melíferas.
- Castelli, L., Branchiccela, B., Garrido, M., Invernizzi, C., Porrini, M., Romero, H., ... & Antúnez, K. (2020). Impact of nutritional stress on honeybee gut microbiota, immunity, and *Nosema ceranae* infection. *Microbial Ecology*, 80(4), 908-919.
- Castelli, L., Branchiccela, B., Romero, H., Zunino, P., & Antúnez, K. (2021a). Seasonal Dynamics of the Honey Bee Gut Microbiota in Colonies Under Subtropical Climate. *Microbial Ecology*, 1-9.
- Castelli, L., Balbuena, S., Branchiccela, B., Zunino, P., Liberti, J., Engel, P., & Antúnez, K. (2021b). Impact of Chronic Exposure to Sublethal Doses of Glyphosate on Honey Bee Immunity, Gut Microbiota and Infection by Pathogens. *Microorganisms*, 9(4), 845.
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*, 198(1), 116-126.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., & Pettis, J.S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1090-1095.

CHDA (Comisión honoraria de desarrollo apícola) (2018) Sector Apícola: Estadísticas de Comercio Exterior. Enero 2018. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/noticia/unidad-organizativa/comision-honoraria-de-desarrollo-apicola-direccion-general-de-la-granja>. Fecha de consulta: 14/03/18.

Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., & de Graaf, D. C. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology*, 61, 13-19.

Chen, Y., Pettis, J.S., Evans, J.D., Kramer, M., & Feldlaufer, M.F. (2004). Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35, 441–448.

Chen, Y., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate pathology*, 92(3), 152-159.

Chen, Y.P., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research*, 70, 33-80.

Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., & Pettis, J. S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of invertebrate pathology*, 97(2), 186-188.

Chen, Y., & Evans, J. D. (2021). *Honey Bee Fungal Diseases. Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*, 295-305.

Collet, T., Ferreira, K. M., Arias, M. C., Soares, A. E. E., & Del Lama, M. A. (2006). Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns. *Heredity*, 97(5), 329-335.

Colwell, M. J., Williams, G. R., Evans, R. C., & Shutler, D. (2017). Honey bee-collected pollen in agro-ecosystems reveals diet diversity, diet quality, and pesticide exposure. *Ecology and Evolution*, 7(18), 7243-7253.

Corby-Harris, V., Maes, P., & Anderson, K. E. (2014a). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PloS one*, 9(4), e95056.

Corby-Harris, V., Snyder, L. A., Schwan, M. R., Maes, P., McFrederick, Q. S., & Anderson, K. E. (2014b). Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7460-7472.

Cordara J. (2005) La Historia de la Apicultura en el Uruguay. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de la Empresa. Montevideo, Uruguay

Cordara, J. (2010). Apicultura: la primera colonia de abejas. Cuadernos de Historia de la Apicultura, 1(1), 1-2.

Court of Justice of the European Union (2021). JUDGMENT OF THE COURT (First Chamber) 6 May 2021 (*) (Appeal – Regulation (EC) No 1107/2009 – Articles 4 and 21 – Criteria for approval – Review of approval – Plant protection products – Implementing Regulation (EU) No 485/2013 – Active substances clothianidin and imidacloprid – Seeds treated with plant protection products containing those active substances – Prohibition of non-professional use

– Precautionary principle), <https://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?text=&docid=240844&pageIndex=0&doclang=EN&mode=req&dir=&occ=first&part=1&cid=199835>. Fecha de consulta: 10/08/2021.

- Cutler, P., Slater, R., Edmunds, A. J., Maienfisch, P., Hall, R. G., Earley, F. G., ... & Crossthwaite, A. J. (2013). Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. *Pest management science*, *69*(5), 607-619.
- Cowles, R. S., & Eitzer, B. D. (2017). Residues of neonicotinoid insecticides in pollen and nectar from model plants. *Journal of Environmental Horticulture*, *35*(1), 24-34.
- Crailsheim, K., & Riessberger-Gallé, U. (2001). Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*, *32*(1), 91-103.
- Cremer, S., Armitage, S. A., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current biology*, *17*(16), R693-R702.
- Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., & Hultmark, D. (1994). The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular and General Genetics MGG*, *242*(2), 152-162.
- De Miranda, J. R., & Fries, I. J. J. O. I. P. (2008). Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of invertebrate pathology*, *98*(2), 184-189.
- De Miranda, J.R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S48–S61.
- Decourtye, A., Lacassie, E., & Pham-Delègue, M. H. (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *59*(3), 269-278.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., & Pham-Delègue, M. H. (2004). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, *57*(3), 410-419.
- Decourtye, A., Mader, E., & Desneux, N. (2010). Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie*, *41*(3), 264-277.
- Decreto n° 482/009 de 2009 (MGAP). Modificaciones de las disposiciones de los decretos n° 149/977 y 113/990 que establecen restricciones para la elaboración y venta de productos fitosanitarios y determinan la exigencia de uso de receta profesional. Octubre del 2009.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, *52*, 81-106.
- Devillers, J. (2002). The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. *Honeybees: estimating the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London, 1-11.
- Diniz, N. M., Soares, A. E. E., Sheppard, W. S., & Del Lama, M. A. (2003). Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*, *26*(1), 47-52
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., ... & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PLoS one*, *8*(8), e72016.
- Di Pasquale, G., Alaux, C., Le Conte, Y., Odoux, J. F., Pioz, M., Vaissière, B. E., ... & Decourtye, A. (2016). Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PLoS one*, *11*(9), e0162818.

- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Evans, J.D., & Chen, Y. (2011). Varroa destructor is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, *92*, 151–155.
- Dietemann, V., Ellis, J. D., & Neumann, P. (2013). The COLOSS BEEBOOK Volume I, Standard methods for *Apis mellifera* research: introduction. *Journal of apicultural research*, *52*(4), 1-4.
- Dong, Z. X., Li, H. Y., Chen, Y. F., Wang, F., Deng, X. Y., Lin, L. B., ... & Guo, J. (2020). Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. *Microbiological research*, *231*, 126370.
- Duay, P., De Jong, D., & Engels, W. (2002). Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by Varroa destructor mites during pupal development. *Genet. Mol. Res.*, *1*(3), 227-232.
- Dunn, P. E. (1986). Biochemical aspects of insect immunology. *Annual review of entomology*, *31*(1), 321-339.
- Dynes, T. L., Berry, J. A., Delaplane, K. S., Brosi, B. J., & de Roode, J. C. (2019). Reduced density and visually complex apiaries reduce parasite load and promote honey production and overwintering survival in honey bees. *PLoS One*, *14*(5), e0216286.
- Ecobichon, D. J. (2001). Toxic effects of pesticides. En: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: McGrawHill.
- Elbert, A., & Nauen, A. (2004). New applications for neonicotinoid insecticides using imidacloprid as an example. In *Insect Pest Management* (pp. 29-44). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *64*(11), 1099-1105.
- Ellegaard, K. M., Tamarit, D., Javelind, E., Olofsson, T. C., Andersson, S. G., & Vásquez, A. (2015). Extensive intra-phylo-type diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC genomics*, *16*(1), 1-22.
- Ellegaard, K. M., & Engel, P. (2019). Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nature communications*, *10*(1), 1-13.
- Ellis, J. D., & Munn, P. A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee world*, *86*(4), 88-101.
- Emery, O., Schmidt, K., & Engel, P. (2017). Immune system stimulation by the gut symbiont Frischella perrara in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular ecology*, *26*(9), 2576-2590.
- Emsen, B., Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Eccles, L., Lacey, B., Ruiz-Pérez, R. A., & Nasr, M. (2016). Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitology research*, *115*(1), 175-181.
- Engel, P., Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(27), 11002-11007.
- Engel, P., Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2013). Frischella perrara gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *63*(Pt_10), 3646-3651.

- Engel, P., James, R. R., Koga, R., Kwong, W. K., McFrederick, Q. S., & Moran, N. A. (2013). Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-24.
- Engel, P., Bartlett, K. D., & Moran, N. A. (2015). The bacterium *Frischella perrara* causes scab formation in the gut of its honeybee host. *MBio*, 6(3), e00193-15.
- Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A., ... & Dainat, B. (2016). The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio*, 7(2), e02164-15.
- Epstein, Y., Chapron, G., & Verheggen, F. (2021). EU Court to rule on banned pesticide use. *Science*.
- European Commission Directorate-General for Health and Food Safety (2021). "Emergency authorisations in the Member States", https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/approval-active-substances/renewal-approval/neonicotinoids_en#emergency_authorisations_. Fecha de consulta: 10/08/2021.
- European Food Safety Authority. (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal*, 11(1), 3068.
- European Food Safety Authority (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin considering all uses other than seed treatments and granules. *EFSA Journal*, 13(8), 4210.
- European Food Safety Authority (2018). *Evaluation of the data on clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam for the updated risk assessment to bees for seed treatments and granules in the EU* (Vol. 15, No. 2, p. 1378E).
- Evans, J. D. (2006). Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of invertebrate pathology*, 93(2), 135-139.
- Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S62-S72.
- Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 719-731.
- Fischer, D., & Moriarty, T. (2014). *Pesticide risk assessment for pollinators*. John Wiley & Sons.
- Fries, I., Granados, R. R., & Morse, R. A. (1992). Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*, 23(1), 61-70.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3), 356-365.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, 103, S73-S79.
- Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., ... & Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28.
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., & Vaissière, B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68 (3), 810–821.

- Gauthier, M. (2010). State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. *Insect nicotinic acetylcholine receptors*, 97-115.
- Genersch, E., & Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary research*, 41(6), 54.
- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Böhler, R., ... & Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332-352
- Gentleman, R., Carey, V., Huber, W., Hahne, F (2019). Genefilter: Methods for Filtering Genes from High-Throughput Experiments. R Package Version 1.68.0. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/genefilter.html>. Fecha de consulta: 10/5/2021.
- Georgiadis, P. T., Pistorius, J., Heimbach, U., Stähler, M., & Schwabe, K. (2012). Dust drift during sowing of maize-effects on honey bees. *Julius-Kühn-Archiv*, (437), 134.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., & Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, 40(2), 117-123.
- Gillespie and, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, 42(1), 611-643.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Di Bernardo, A., ... & Tapparo, A. (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of economic entomology*, 102(5), 1808-1815.
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M. C., Linde, A., & Genersch, E. (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 3032-3038.
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., & Genersch, E. (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental microbiology*, 13(2), 404-413.
- Glinski, Z., & Jarosz, J. (1995a). Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World*, 76(4), 195-205.
- Gliński, Z., & Jarosz, J. (1995b). Mechanical and biochemical defences of honey bees. *Bee World*, 76(3), 110-118.
- Goblirsch, M., Huang, Z. Y., & Spivak, M. (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One*, 8(3), e58165.
- Gómez-Moracho, T., Heeb, P., & Lihoreau, M. (2017). Effects of parasites and pathogens on bee cognition. *Ecological Entomology*, 42, 51-64.
- Good, A. P., Gauthier, M. P. L., Vannette, R. L., & Fukami, T. (2014). Honey bees avoid nectar colonized by three bacterial species, but not by a yeast species, isolated from the bee gut. *PLoS one*, 9(1), e86494.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flower. *American Association for the Advancement of Science*, 347(6229), 1435- 1446.

- Gray, A., Adjlane, N., Arab, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J. D., ... & Dahle, B. (2020). Honey bee colony winter loss rates for 35 countries participating in the COLOSS survey for winter 2018–2019, and the effects of a new queen on the risk of colony winter loss. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 744-751.
- Greatti, M., Sabatini, A. G., Barbattini, R., Rossi, S., & Stravisi, A. (2003). Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 56, 69-72.
- Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M. M., Arechavaleta-Velasco, M. E., Koleoglu, G., Valizadeh, P., & Correa-Benítez, A. (2011). *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in Mexico since at least 2004. *Journal of Apicultural Research*, 50(2), 167-169.
- Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., Ricci, I., Boudabous, A., Borin, S., Manino, A., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., & Cherif, A. (2011). Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied Entomology*, 135(7), 524-533.
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *The fungal kingdom*, 97-113.
- Handford, C.E., Elliott, C.T., & Campbell, K. (2015). A Review of the Global Pesticide Legislation and the Scale of Challenge in Reaching the Global Harmonization of Food Safety Standards. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 11(4), 1-12.
- Hein, L. (2009). The Economic Value of the Pollination Service, a Review Across Scales. *The Open Ecology Journal*, 2, 74-82.
- Higes, M., Martín, R., & Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, 92(2), 93-95.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C., & Meana, A. (2009). The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 217-219.
- Higes, M., Martín Hernández, R., & Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C Nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., & Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 17-29.
- Highfield A.C., El Nagar A., Mackinder L.C.M., Noël L.M.-L.J., Hall M.J., Martin S.J., Schroeder D.C. (2009) Deformed wing virus implicated in overwintering honey bee colony losses, *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7212–7220.
- Hopwood, J., Vaughan, M., Shepherd, M., Biddinger, D., Mader, E., Black, S. H., & Mazzacano, C. (2012). Are neonicotinoids killing bees. *A review of research into the effects of neonicotinoid insecticides on bees, with recommendations for action. Xerces Society for Invertebrate Conservation, USA.*
- Horsak, R. D., Bedient P. B., Hamilton M. C., Thomas F. B. (1964). Pesticides. En Morrison, R. D., & Murphy, B. L. (Ed.), *Environmental forensics: contaminant specific guide*. Elsevier.
- Hou, R., Zhang, Z., Pang, S., Yang, T., Clark, J. M., & He, L. (2016). Alteration of the nonsystemic behavior of the pesticide ferbam on tea leaves by engineered gold nanoparticles. *Environmental science & technology*, 50(12), 6216-6223.

- Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., & Wang, C. H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, *38*(1), 30-37.
- Huang, S. K., Ye, K. T., Huang, W. F., Ying, B. H., Su, X., Lin, L. H., ... & Hu, J. Z. (2018). Influence of feeding type and *Nosema ceranae* infection on the gut microbiota of *Apis cerana* workers. *MSystems*, *3*(6), e00177-18.
- Hughes, R. N., & Brimblecombe, P. (1994). Dew and guttation: formation and environmental significance. *Agricultural and Forest Meteorology*, *67*(3-4), 173-190.
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., ... & Zheng, H. Q. (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, *52*(4), 1-53.
- Imler, J. L., & Bulet, P. (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Mechanisms of epithelial defense*, *86*, 1-21.
- Imran, M., Sheikh, U. A. A., Nasir, M., Ghaffar, M. A., Tamkeen, A., & Iqbal, M. A. (2019). Do neonicotinoid insecticides impaired olfactory learning behavior in *Apis mellifera*?. *International Journal of Industrial Entomology*, *38*(1), 1-5.
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., ... & Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of invertebrate pathology*, *101*(2), 150-153.
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J. P., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., & Zunino, P. (2011). Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, *47*(181), 15-27.
- IUPAC (2021) Imidacloprid (Ref: BAY NTN 33893). Disponible en: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/397.htm#none>. Fecha de consulta: 08/03/2021.
- Jactel, H., Verheggen, F., Thiéry, D., Escobar-Gutiérrez, A. J., Gachet, E., Desneux, N., & Neonicotinoids Working Group. (2019). Alternatives to neonicotinoids. *Environment international*, *129*, 423-429.
- Jander, R. (1976). Grooming and pollen manipulation in bees (Apoidea): the nature and evolution of movements involving the foreleg. *Physiological Entomology*, *1*(3), 179-194.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(7), 2897-2908.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., & Allsopp, M. H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of invertebrate pathology*, *84*(2), 96-103.
- Jiang, J., Ma, D., Zou, N., Yu, X., Zhang, Z., Liu, F., & Mu, W. (2018). Concentrations of imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*, *201*, 159-167.
- Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral ecology and sociobiology*, *64*(3), 305-316.
- Jones, A. K., & Sattelle, D. B. (2010). Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. In *Insect nicotinic acetylcholine receptors* (pp. 25-43). Springer, New York, NY.

- Jones, J. C., Fruciano, C., Hildebrand, F., Al Toufalilia, H., Balfour, N. J., Bork, P., ... & Hughes, W. O. (2018). Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and evolution*, 8(1), 441-451.
- Kogabu, S. (2011). Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2887-2896
- Kapheim, K. M., Rao, V. D., Yeoman, C. J., Wilson, B. A., White, B. A., Goldenfeld, N., & Robinson, G. E. (2015). Caste-specific differences in hindgut microbial communities of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 10(4), e0123911.
- Kent, R. B. (1988). The introduction and diffusion of the African honeybee in South America. *Yearbook of the Association of Pacific Coast Geographers*, 50(1), 21-43.
- Kešnerová, L., Moritz, R., & Engel, P. (2016). *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(1), 414-421.
- Kerr W. Introducao de abelhas africanas no Brasil. *BrasApic* 1957; 3:211-13.
- Klein, A.M., Be, V., Cane, J.H., Steffandewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society*, 274, 303-313.
- Kleinbaum, D. G., & Klein, M. (2012). Kaplan-Meier survival curves and the log-rank test. In *Survival analysis* (pp. 55-96). Springer, New York, NY.
- Khan, K. A., Al-Ghamdi, A. A., Ghramh, H. A., Ansari, M. J., Ali, H., Alamri, S. A., ... & Hafeez, M. (2020). Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microbial pathogenesis*, 138, 103793.
- Krajc, J., & Fuchs, S. (2006). Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, 37(5), 577-587.
- Kukielka, D., Esperón, F., Higes, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of virological methods*, 147(2), 275-281.
- Kulhanek, K., Steinhauer, N., Rennich, K., Caron, D.M., Sagili, R.R., Pettis, J.S., Ellis, J.D., Wilson, M.E., Wilkes, J.T., Tarpy, D.R., Rose, R., Lee, K., Rangel, J. & VanEngelsdorp, D. (2017) A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 56, 328–340
- Kulinčević, J. M., & Rothenbuhler, W. C. (1975). Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. *Journal of Invertebrate pathology*, 25(3), 289-295.
- Kundoo, A. A., Dar, S. A., Mushtaq, M., Bashir, Z., Dar, M. S., Gul, S., ... & Gulzar, S. (2018). Role of neonicotinoids in insect pest management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 333-339.
- Kurze, C., Routtu, J., & Moritz, R. F. (2016). Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*, 119(4), 290-297
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2013). Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order

- 'Enterobacteriales' of the Gammaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_6), 2008-2018.
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374-384.
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374-384.
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society open science*, 4(2), 170003.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2001). Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology*, 47(9), 965-974.
- Le Conte, Y., & Navajas, M. (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 27(2), 499-510.
- LeBoeuf, A. C. (2017). Trophallaxis. *Current Biology*, 27(24), R1299-R1300.
- Lee, F. J., Rusch, D. B., Stewart, F. J., Mattila, H. R., & Newton, I. L. (2015). Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental microbiology*, 17(3), 796-815.
- Liu, T. P. (1984). Ultrastructure of the midgut of the worker honey bee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *Journal of invertebrate pathology*, 44(3), 282-291.
- Li, Z., Li, M., He, J., Zhao, X., Chaimanee, V., Huang, W. F., ... & Su, S. (2017). Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 140, 1-8.
- Li, C. (2019). Understanding, conservation and protection of precious natural resources-bees. I" *Evolutionary Progress in Science, Technology, Engineering, Arts, and Mathematics (STEAM) I*", Volume 2, Number 1, August 2019; Lenox Institute Press, PO Box 405, Newtonville, NY, 12128-0405, USA, 1-65.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 1-21.
- Lu, C., Hung, Y. T., & Cheng, Q. (2020). A review of sub-lethal neonicotinoid insecticides exposure and effects on pollinators. *Current Pollution Reports*, 6(2), 137-151.
- Lunardi, J. S., Zaluski, R., & Orsi, R. O. (2017). Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides fipronil and imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 50-56.
- Maes, P. W., Rodrigues, P. A., Oliver, R., Mott, B. M., & Anderson, K. E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 25(21), 5439-5450.
- Maienfish, P., Brandl, F., Kobel, W., Rindlisbacher, A., & Senn, R. (1999). CGA 293'343: A novel, broad-spectrum neonicotinoid insecticide. In *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor* (pp. 177-209). Springer, Tokyo.
- Makkar, G. S., Chhuneja, P. K., & Singh, J. (2020). Morphometric characterization of *Apis* species (Hymenoptera: Apoidea). *Vegetos*, 33(3), 538-544.

- Mani, P., VT, F., Bowman, K., TS, C., Keshavarz, T., & Kyazze, G. (2020). Development of an electroactive aerobic biocathode for microbial fuel cell applications. *Environmental Microbiology Reports*, 12(5), 607-612.
- Manzoor, M. U. D. A. S. A. R., Mathivanan, V., Nabi, G. H., Mir, G. M., & Sabhanayakam, S. (2013). Nosemosis and its effect on performance of honey bees-a review. *Int J Pharm Bio Sci*, 4, 923-937.
- Marche, M. G., Satta, A., Floris, I., Pusceddu, M., Buffa, F., & Ruiu, L. (2019). Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from Varroa-infested colonies. *Journal of Apicultural Research*, 58(3), 444-454.
- Martin, S.J. (2001). The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, 38, 1082–1093.
- Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., ... & Schroeder, D. C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304-1306.
- Martin, S. J., & Brettell, L. E. (2019). Deformed wing virus in honeybees and other insects. *Annual review of virology*, 6, 49-69.
- 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(20), 6331-6338.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., ... & Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental microbiology*, 20(4), 1302-1329.
- Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S., & Moran, N. A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20(3), 619-628.
- Martinson, V. G., Moy, J., & Moran, N. A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2830-2840.
- Matheson, A. (1995). First documented findings of Varroa jacobsoni outside its presumed natural range. *Apiacta*, 30, 1-8.
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., & Sattelle, D.B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 22(11), 573-580.
- Mattila, H. R., Rios, D., Walker-Sperling, V. E., Roeselers, G., & Newton, I. L. (2012). Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. *PLoS One*, 7(3), e32962.
- Mazzei, M., Carrozza, M. L., Luisi, E., Forzan, M., Giusti, M., Sagona, S., ... & Felicioli, A. (2014). Infectivity of DWV associated to flower pollen: experimental evidence of a horizontal transmission route. *PLoS One*, 9(11), e113448.
- McArt, S. H., Koch, H., Irwin, R. E., & Adler, L. S. (2014). Arranging the bouquet of disease: floral traits and the transmission of plant and animal pathogens. *Ecology letters*, 17(5), 624-636.

- McGregor, S. E. (1976). *Insect pollination of cultivated crop plants* (Vol. 496). Washington, DC: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). PhyloSeq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*, *8*(4), e61217.
- Medici, S. K., Sarlo, E. G., Porrini, M. P., Braunstein, M., & Eguaras, M. J. (2012). Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology research*, *110*(2), 859-864.
- Mendoza, Y., Antúnez, K., Branchiccela, B., Anido, M., Santos, E., & Invernizzi, C. (2014). *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie*, *45*(2), 224-234.
- Mendoza, Y., Tomasco, I. H., Antúnez, K., Castelli, L., Branchiccela, B., Santos, E., & Invernizzi, C. (2020). Unraveling Honey Bee–Varroa destructor Interaction: Multiple Factors Involved in Differential Resistance between Two Uruguayan Populations. *Veterinary sciences*, *7*(3), 116.
- Michalczyk, M., & Sokół, R. (2014). Nosemosis in honey bees. *Polish Journal of Natural Sciences*, *29*(1), 91-99.
- Michener, C. D. (1990). Classification of the Apidae (hymenoptera). *The University of Kansas Science Bulletin*, *54*(4), 75.
- Miller, D. L., Parish, A. J., & Newton, I. L. (2019). Transitions and transmission: Behavior and physiology as drivers of honey bee-associated microbial communities. *Current opinion in microbiology*, *50*, 1-7.
- Mitchell, E. A., Mulhauser, B., Muloł, M., Mutabazi, A., Glauser, G., & Aebi, A. (2017). A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, *358*(6359), 109-111.
- MGAP (2015) Regiones agropecuarias del Uruguay. Disponible en: <http://www2.mgap.gub.uy/DieaAnterior/regiones/Regiones2015.pdf>. Fecha de consulta: 14/03/18.
- MGAP (2017) Censo anual estadístico agropecuario 2017. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf>. Fecha de consulta: 14/03/18.
- MGAP (2019) Importaciones de productos fitosanitarios. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/importaciones-productos-fitosanitarios>. Fecha de consulta: 12/11/2020.
- MGAP (2020a) Anuario estadístico agropecuario 2020. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuario-2020> Fecha de consulta: 11/11/20.
- MGAP (2020b) Exportaciones de productos apícolas por año/rubro (en kg). Disponible en: <https://www.mgap.gub.uy/RegistroApicola/arExpoAnioRubroWEB.aspx> Fecha de consulta: 11/11/20.
- Molineri, A. I., Pacini, A., Giacobino, A., Bulacio-Cagnolo, N., Aignasse, A., Zago, L., ... & Bertozzi, E. (2017). Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Revista Argentina de microbiología*, *49*(2), 166-173.

- Moran, N. A., Plague, G. R., Sandström, J. P., & Wilcox, J. L. (2003). A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(suppl 2), 14543-14548.
- Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E., & Sabree, Z. L. (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS one*, *7*(4), e36393.
- Moran, N. A. (2015). Genomics of the honey bee microbiome. *Current opinion in insect science*, *10*, 22-28.
- Motta, E. V., & Moran, N. A. (2020). Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure. *Msystems*, *5*(4), e00268-20.
- Mullins, J. W. (1993). Imidacloprid: a new nitroguanidine insecticide.
- Murphy, S. D. (1986). Toxic effects of pesticides. En: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: Macmillan.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Elbert, A., Jeschke, P., & Tietjen, K. (2001). Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. In *Biochemical sites of insecticide action and resistance* (pp. 77-105). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Naug, D., & Camazine, S. (2002). The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *Journal of theoretical Biology*, *215*(4), 427-439.
- Nappi, A. J., & Christensen, B. M. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, *35*(5), 443-459.
- Nazzi, F., & Le Conte, Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, *61*, 417-432.
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page Jr, R. E., & Amdam, G. V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS biology*, *5*(3), e62.
- Neov, B., Georgieva, A., Shumkova, R., Radoslavov, G., & Hristov, P. (2019). Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity*, *11*(12), 237.
- Niell, S., Jesus, F., Perez, C., Mendoza, Y., Diaz, R., Franco, J., ... & Heinzen, H. (2015). QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(18), 4484-4492.
- Niell, S., Jesús, F., Pérez, N., Pérez, C., Pareja, L., Abbate, S., ... & Heinzen, H. (2017). Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: towards a pesticide residues biomonitor. *Science of the Total Environment*, *581*, 25-31.
- Noël, A., Le Conte, Y., & Mondet, F. (2020). *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it?. *Emerging Topics in Life Sciences*, *4*(1), 45-57.
- Nurie, Y. A. (2020). Factors Affecting bee Colony Absconding and Prevention Mechanism in Ethiopia.
- Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology & Evolution*, *14*(8), 312-315.

Okazawa, A., Akamatsu, M., Ohoka, A., Nishiwaki, H., Cho, W. J., Nakagawa, Y., ... & Ueno, T. (1998). Prediction of the binding mode of imidacloprid and related compounds to house-fly head acetylcholine receptors using three-dimensional QSAR analysis. *Pesticide science*, *54*(2), 134-144.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., *et al.* (2019) Vegan: community ecology package. R package version 2.5–6. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Fecha de consulta: 10/5/2021.

Palmer, K. A., & Oldroyd, B. P. (2003). Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften*, *90*(6), 265-268.

PAN Europe (2021). World Bee Day: European bees abandoned by policy makers.

Panjad, P., Yongsawas, R., Sinpoo, C., Pakwan, C., Subta, P., Krongdang, S., ... & Disayathanoowat, T. (2021). Impact of Nosema Disease and American Foulbrood on Gut Bacterial Communities of Honeybees *Apis mellifera*. *Insects*, *12*(6), 525.

Pantoja, A., Smith-Pardo, A., García, A., Sáenz, A., & Rojas, A. (2014). Principios y avances sobre la polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe. Santiago, Chile, FAO, 56p.

Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., ... & Heinzen, H. (2011). Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International journal of environmental research and public health*, *8*(10), 3844-3858.

Paris, L., El Alaoui, H., Delbac, F., & Diogon, M. (2018). Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Current opinion in insect science*, *26*, 149-154.

Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S., & Fries, I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, *38*(6), 558-565.

Peixoto, C. M., França, S. O., da Cruz Mercês, C., Correia-Oliveira, M. E., & de Carvalho, C. A. L. (2021). Occurrence of pathogenic viruses in Africanized honey bees in Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 1-8.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, *29*(9), e45-e45.

Pohorecka, K., Skubida, P., Miszczak, A., Semkiw, P., Sikorski, P., Zagibajto, K., ... & Bober, A. (2012). Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *Journal of Apicultural Science*, *56*(2), 115-134.

Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., ... & Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, *540*(7632), 220-229.

Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., & Moran, N. A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and environmental microbiology*, *80*(23), 7378-7387.

Powell, J. E., Leonard, S. P., Kwong, W. K., Engel, P., & Moran, N. A. (2016). Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(48), 13887-13892.

Proyecto de Ley n° 3828 (2019). "Protección de la Producción Apícola". Comisión de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Mułenko, W., & Demetraki-Paleolog, J. (2014). Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 537-544.

Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., ... & Hawthorne, D. (2019). Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792-1801.

Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current opinion in insect science*, 26, 97-104.

Raymann, K., Motta, E. V., Girard, C., Riddington, I. M., Dinser, J. A., & Moran, N. A. (2018). Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. *Applied and environmental microbiology*, 84(13), e00545-18.

Remolina, S. C., & Hughes, K. A. (2008). Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age*, 30(2-3), 177.

Requier, F., Antúnez, K., Morales, C. L., Aldea Sánchez, P., Castilhos, D., Garrido, P. M., ... & Garibaldi, L. A. (2018). Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 657-662.

Regulation n° 1107/2009 (UE). European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market (2021); Article 53, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02009R1107-20210327>. Fecha de consulta: 10/08/2021.

Resolución n° 60/019 de 2019 (MGAP). DGSA: Extender la exigencia de presentación de receta profesional y los términos requeridos para la misma que se establecen en el decreto N°482/009 para la compraventa de productos insecticidas (importados o fabricación nacional). 9 de abril de 2019.

Resolución n° 504/020 del 2020 (MGAP). DGSA: Obligación de Declarar relación de Stock de productos fitosanitarios de venta bajo Receta Profesional. 8 de septiembre del 2020.

Rinderer, T. E., Rothenbuhler, W. C., & Kulinčević, J. M. (1975). Responses of three genetically different stocks of the honeybee to a virus from bees with hairless-black syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25(3), 297-300.

Rodriguez, M., Vargas, M., Gerding, M., Navarro, H., & Antúnez, K. (2012). Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 51(3), 285-287.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S96–S119.

Roossinck, M. J. (2015). Move over, bacterial! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. *Journal of virology*, 89(13), 6532-6535.

Rouzé, R., Moné, A., Delbac, F., Belzunces, L., & Blot, N. (2019). The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes and environments*, ME18169.

Rstudio team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Boston, MA, USA.

- Rueppell, O., Hayworth, M. K., & Ross, N. P. (2010). Altruistic self-removal of health-compromised honey bee workers from their hive. *Journal of evolutionary biology*, *23*(7), 1538-1546.
- Ruttner, F. (1988) Biogeography and taxonomy of honeybees. P. in.: Springer-Verlag, 284 p
- Salina, M. D., Garcia, M. L. G., Bais, B., Bravi, M. E., Brasesco, C., Maggi, M., ... & Reynaldi, F. J. (2021). Viruses that affect Argentinian honey bees (*Apis mellifera*). *Archives of Virology*, 1-13.
- Salmela, H., & Sundström, L. (2018). Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. *Inflammation and Cell Signaling*, *5*.
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2016). Impacts of pesticides on honey bees. *Beekeeping and Bee Conservation-Advances in Research*, *4*, 77-97.
- 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.
- Schaerers, G.A. (1996). Status of Pesticide Policy and Regulations in Developing Countries. *Journal Agricultural Entomology*, *13*(3), 213-22.
- Schittny, D., Yañez, O., & Neumann, P. (2020). Honey Bee Virus Transmission via Hive Products. *Veterinary sciences*, *7*(3), 96.
- Schmidt, J. O. (1997). Bee products. In *Bee Products* (pp. 15-26). Springer, Boston, MA.
- Schmolke, A., Kearns, B., & O'Neill, B. (2018). Plant guttation water as a potential route for pesticide exposure in honey bees: a review of recent literature. *Apidologie*, *49*(5), 637-646.
- Schmuck, R., Schöning, R., Stork, A., & Schramel, O. (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *57*(3), 225-238.
- Schmuck, R., Nauen, R., & Ebbinghaus-Kintscher, U. (2003). Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. *Bulletin of insectology*, *56*(1), 27-34.
- Schneider, P. M. (1985). Purification and properties of three lysozymes from hemolymph of the cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Insect Biochemistry*, *15*(4), 463-470.
- Schroeder, D. C., & Martin, S. J. (2012). Deformed wing virus: The main suspect in unexplained honeybee deaths worldwide. *Virulence*, *3*(7), 589-591.
- Seeley, T. D. (2009). *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., & Cox-Foster, D. (2005). Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, *86*, 2281–2289.
- Shi, M., Lin, X. D., Tian, J. H., Chen, L. J., Chen, X., Li, C. X., ... & Buchmann, J. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, *540*(7634), 539-543.
- Simone, M., Evans, J. D., & Spivak, M. (2009). Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, *63*(11), 3016-3022.

- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3), 295-311.
- Simone-Finstrom, M. (2017). Social immunity and the superorganism: Behavioral defenses protecting honey bee colonies from pathogens and parasites. *Bee World*, 94(1), 21-29.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., ... & Wiemers, M. (2014). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5-34.
- Singh, S. (2014). Guttation: path, principles and functions. *Australian Journal of Botany*, 61(7), 497-515.
- Smith, E. A., Anderson, K. E., Corby-Harris, V., McFrederick, Q. S., Parish, A. J., Rice, D. W., & Newton, I. L. (2021). Reclassification of seven honey bee symbiont strains as *Bombella apis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(9), 004950.
- Solomon, K. R., & Stephenson, G. L. (2017). Quantitative weight of evidence assessment of higher-tier studies on the toxicity and risks of neonicotinoid insecticides in honeybees 1: Methods. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(6-7), 316-329.
- Somerville, D. (2000). Honey bee nutrition and supplementary feeding. *Agnote DAI/178, NSW Agriculture*.
- Spivak, M. (1996). Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 27(4), 245-260.
- Spivak, M., & Downey, D. L. (1998). Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 91(1), 64-70.
- Spivak, M., & Gilliam, M. (1998). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*: Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee world*, 79(3), 124-134.
- Starks, P. T., Blackie, C. A., & Seeley, T. D. (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87(5), 229-231.
- Staubach, F., Baines, J. F., Künzel, S., Bik, E. M., & Petrov, D. A. (2013). Host species and environmental effects on bacterial communities associated with *Drosophila* in the laboratory and in the natural environment. *PloS one*, 8(8), e70749.
- Steinhauer N, Kulhanek K, Antúnez K, Human H, Chantawannakul P, Chauzat MP, vanEngelsdorp D (2018) Drivers of colony losses. *Curr Opin Insect Sci* 26:142–148.
- Stenersen, J. (2000). *Chemical pesticides mode of action and toxicology*. CRC press.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L.P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(11), 2482-2486.
- Tang, J., Ma, C., Shi, W., Chen, X., Liu, Z., Wang, H., & Chen, C. (2020). A National Survey of Managed Honey Bee Colony Winter Losses (*Apis mellifera*) in China (2013–2017). *Diversity*, 12(9), 318.
- Tapparo, A., Giorio, C., Marzaro, M., Marton, D., Soldà, L., & Girolami, V. (2011). Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(6), 1564-1568.

- Tarek, H., Hamiduzzaman, M. M., Morfin, N., & Guzman-Novoa, E. (2018). Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*). *Genetics and Molecular Research*, *17*(2), 1-76.
- Tarpy, D. R., & Pettis, J. S. (2013). Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften*, *100*(8), 723-728.
- Tarpy, D. R., Mattila, H. R., & Newton, I. L. (2015). Development of the honey bee gut microbiome throughout the queen-rearing process. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(9), 3182-3191.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., & Bergoin, M. (2004). Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and Varroa destructor Mite Populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7185–7191.
- Teixeira, E. W., dos Santos, L. G., Sattler, A., Message, D., Alves, M. L. T. M. F., Martins, M. F., ... & Franco, T. M. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, *114*(3), 250-254.
- Terali, K. (2018). An evaluation of neonicotinoids' potential to inhibit human cholinesterases: Protein–ligand docking and interaction profiling studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *84*, 54-63.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*, *48*(1), 339-364.
- Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A., ... & McAfee, A. (2020). Varroa destructor: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology*.
- Van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.M., & Belzunces, L.P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, *5*(3-4), 293-305.
- Van der Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bijleveld van Lexmond, M. F., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., ... & Wiemers, M. (2015). Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(1), 148-154.
- 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, M., Arismendi, N., Riveros, G., Zapata, N., Bruna, A., Vidal, M., ... & Gerding, M. (2017). Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chilean journal of agricultural research*, *77*(3), 243-249.
- Vávra, J., & Ronny Larsson, J. I. (1999). Structure of the microsporidia. *The microsporidia and microsporidiosis*, 7-84.
- Vidal-Naquet, N. (2012). Les maladies de l'abeille domestique d'élevage, *Apis mellifera* L. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, *165* (4), 307- 316

- Vincent, C., Hallman, G., Panneton, B., & Fleurat-Lessard, F. (2003). Management of agricultural insects with physical control methods. *Annual review of entomology*, 48(1), 261-281.
- Visscher, P. K., Crailsheim, K., & Sherman, G. (1996). How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights?. *Journal of Insect Physiology*, 42(11-12), 1089-1094.
- Waitt, A.W. (1975). Pesticide Legislation and Industry. *Pest Management Science*, 6 (2), 199-208.
- Wakita, T., Kinoshita, K., Yamada, E., Yasui, N., Kawahara, N., Naoi, A., ... & Kodaka, K. (2003). The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 59(9), 1016-1022.
- Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., ... & Martínez, M. A. (2018). Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism. *Annual review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 471-507.
- Wang, Q., Dai, P., Guzman-Novoa, E., Wu, Y., Hou, C., & Diao, Q. (2019). *Nosema ceranae*, the most common microsporidium infecting *Apis mellifera* in the main beekeeping regions of China since at least 2005. *Journal of Apicultural Research*, 58(4), 562-566.
- Wang, H., Liu, C., Liu, Z., Wang, Y., Ma, L., & Xu, B. (2020). The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering. *BMC microbiology*, 20(1), 1-14.
- Webster, M. T. (2019). *Apis mellifera*. *Trends in Genetics*, 35(11), 880-881.
- Weinberg, K.P., & Madel, G. (1985). The influence of the mite *Varroa Jacobsoni* Oud. on the protein concentration and the haemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, Springer Verlag, 16 (4), 421-436.
- Weiss, L. M., & Becnel, J. J. (2014). *Microsporidia: pathogens of opportunity*. John Wiley & Sons.
- Welch, A., Drummond, F., Tewari, S., Averill, A., & Burand, J. P. (2009). Presence and prevalence of viruses in local and migratory honeybees (*Apis mellifera*) in Massachusetts. *Applied and environmental microbiology*, 75(24), 7862-7865.
- White, G. F. (1913). *Sacbrood, a disease of bees* (No. 169). US Government Printing Office.
- Whitfield, C. W., Behura, S. K., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Johnston, J. S., Sheppard, W. S., ... & Tsutsui, N. D. (2006). Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799), 642-645.
- Williams, I. H. (2002). Insect pollination and crop production: a European perspective. *Pollinating Bees-The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. Ministry of Environment, Brasilia, 59-65.
- Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csaki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., ... & Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-36.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H., & Starks, P. T. (2009). Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual review of entomology*, 54, 405-423.
- Winston, M. L., Otis, G. W., & Taylor Jr, O. R. (1979). Absconding behaviour of the Africanized honeybee in South America. *Journal of Apicultural Research*, 18(2), 85-94.

- Winston, M. L., & Katz, S. J. (1981). Longevity of cross-fostered honey bee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. *Canadian Journal of Zoology*, *59*(8), 1571-1575.
- Winston, M. L., & Katz, S. J. (1982). Foraging differences between cross-fostered honeybee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *10*(2), 125-129.
- Winston, M. L., Taylor, O. R., & Otis, G. W. (1983). Some differences between temperate European and tropical African and South American honeybees. *Bee World*, *64*(1), 12-21.
- Winston, M. L. (1991). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press.
- Witzgall, P., Kirsch, P., & Cork, A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of chemical ecology*, *36*(1), 80-100.
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *78*(6), 927-938.
- Woodcock, B. A., Ridding, L., Pereira, M. G., Sleep, D., Newbold, L., Oliver, A., ... & Pywell, R. F. (2021). Neonicotinoid use on cereals and sugar beet is linked to continued low exposure risk in honeybees. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *308*, 107205.
- Wu, M., Sugimura, Y., Taylor, D., & Yoshiyama, M. (2013). Honeybee gastrointestinal bacteria for novel and sustainable disease control strategies. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture*, *8*(2), 85-90.
- Wyatt, G. R. (1961). The biochemistry of insect hemolymph. *Annual review of entomology*, *6*(1), 75-102.
- Xiang, H., Wei, G. F., Jia, S., Huang, J., Miao, X. X., Zhou, Z., ... & Huang, Y. P. (2006). Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Canadian Journal of Microbiology*, *52*(11), 1085-1092.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*, *80*(1), 75-84.
- Yadav, S., & Kaushik, H. D. (2017). Diseases and Enemies of Honeybees. In *Industrial Entomology* (pp. 67-108). Springer, Singapore.
- Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(21), 7470-7475.
- Yang, X., & Cox-Foster, D. (2007). Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*, *134*(3), 405-412.
- Yañez, O., Piot, N., Dalmon, A., de Miranda, J. R., Chantawannakul, P., Panziera, D., ... & Chejanovsky, N. (2020). Bee viruses: Routes of infection in Hymenoptera. *Frontiers in microbiology*, *11*, 943.
- Yu, S. J. (2008). *The toxicology and biochemistry of insecticides*. CRC press.
- Zaobidna, E. A., Żółtowska, K., & Łopieńska-Biernat, E. (2017). *Varroa destructor* induces changes in the expression of immunity-related genes during the development of *Apis mellifera* worker and drone broods. *Acta Parasitologica*, *62*(4), 779-789.

- Zander, E. (1909). Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31, 196-204.
- Zhang, W., Jiang, F., & Ou, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2), 125-144.
- Zhao, H., Li, G., Guo, D., Wang, Y., Liu, Q., Gao, Z., ... & Xu, B. (2020). Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Science of The Total Environment*, 744, 140819.
- Zheng, H. Q., Gong, H. R., Huang, S. K., Sohr, A., Hu, F. L., & Chen, Y. P. (2015). Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus. *Veterinary microbiology*, 177(1-2), 1-6.
- Zheng, H., Nishida, A., Kwong, W. K., Koch, H., Engel, P., Steele, M. I., & Moran, N. A. (2016). Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *MBio*, 7(6), e01326-16.
- Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18), 4775-4780.
- Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 316-322.