

**Tesis de grado para la Obtención del Título de Licenciado en Ciencias
Biológicas, Universidad de la República**

**DESARROLLO DE COLONIAS DE ABEJORROS *BOMBUS PAULOENSIS* Y
BOMBUS BELLICOSUS (HYMENOPTERA: APIDAE) BAJO DOS DIETAS DE
POLEN.**



Bach: Juan Ignacio Davoine

Orientadora: Dra. Sheena Salvarrey

Co-orientadora: Dra. Loreley Castelli

**Facultad de Ciencias, Sección Etología,
Montevideo, Uruguay, 2024.**

i. RESUMEN

Los abejorros del género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) son excelentes polinizadores que contribuyen al mantenimiento de ecosistemas naturales y a la producción agrícola. Uruguay cuenta con la presencia de dos especies nativas, *Bombus pauloensis* y *B. bellicosus* las cuales, junto con otros polinizadores, ven amenazadas sus poblaciones por diversas causas entre las que se encuentra la falta de alimento debido a monocultivos. En este estudio se evaluó el impacto de la nutrición en el desarrollo de las colonias de abejorros, así como en su sanidad. Para ello, reinas de ambas especies fueron colectadas y confinadas en condiciones de cautiverio. Dos dietas de pólenes fueron establecidas: una monofloral (*Eucalyptus grandis*), y otra polifloral (de diverso origen botánico), obteniéndose cuatro grupos. El desarrollo de las colonias fue evaluado de acuerdo con los siguientes parámetros: día de inicio de la oviposición, celdas de cría observadas, emergencia de obreras, peso fresco y peso seco de la cabeza de las mismas. A su vez, se extrajo el ADN intestinal de obreras y reinas el cual se sometió a PCR para evaluar la presencia de *Nosema ceranae*, *Nosema apis* y *Nosema bombi*. Del total de reinas colectadas en cada grupo, entre el 48 y 61,5% inició la oviposición, sin encontrarse diferencias entre especies o tratamientos. La dieta resultó ser una variable significativa únicamente en la especie *B. pauloensis*, la cual presentó mayores valores de peso fresco de las obreras emergidas y peso seco de las cabezas, en las colonias que tuvieron una dieta monofloral. A su vez, dicha especie presentó un mayor número de obreras que *B. bellicosus* a los 40 días de iniciada la cría. Únicamente se detectó la presencia de *N. ceranae* en el total de colonias analizadas (n=44). Los resultados obtenidos sugieren que las diferentes especies de abejorros pueden tener distintos requerimientos nutricionales y que el origen botánico del polen puede afectar diferencialmente el desarrollo de sus colonias. A su vez demuestran la importancia de utilizar una amplia variedad de especies como modelo para entender el impacto de la nutrición en el desarrollo y sanidad de la gran diversidad de ápidos existente.

ii. TABLA DE CONTENIDO

i. RESUMEN.....	2
ii. TABLA DE CONTENIDO.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Generalidades del género <i>Bombus</i>	4
1.2 Especies presentes en Uruguay.....	5
1.3 Ciclo de vida.....	5
1.4 Cría en cautiverio.....	7
1.5 Nutrición.....	8
1.6 Influencia de la nutrición en la condición sanitaria de los Apidae.....	10
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:.....	13
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivo general.....	13
2.3 Objetivos específicos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Colecta de abejorros.....	14
3.2 Tipos de dietas.....	14
3.3 Cría en cautiverio.....	15
3.4 Identificación de especies de <i>Nosema</i>	17
3.4.1 Extracción de ADN.....	18
3.4.2 Amplificación de ADN mediante PCR.....	18
3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa	20
3.5 Análisis de datos.....	20
4. RESULTADOS.....	21
4.1 Desarrollo de colonias.....	21
4.2 Consumo de polen y jarabe.....	26
4.3 Tamaño de las colonias.....	27
4.4 Tiempo de desarrollo postembrionario.....	30
4.5 Peso fresco de las obreras emergidas.....	31
4.6 Peso seco de la cabeza de las obreras.....	33
4.7 Detección de microsporidios <i>Nosema ceranae</i> , <i>Nosema apis</i> y <i>Nosema bombi</i>	34
5. DISCUSIÓN.....	38
6. CONCLUSIONES.....	43
7. PERSPECTIVAS.....	44
7. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA.....	45
8. BIBLIOGRAFÍA.....	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del género *Bombus*

La superfamilia Apoidea (Hymenoptera), la cual incluye a todas las abejas, es uno de los grupos más diversos de insectos, con aproximadamente 20.000 especies descritas (Goulson, 2010; Michener, 2007). Entre éstas, 250 se conocen como “abejorros” y pertenecen a un único taxón; el género *Bombus*. Este se encuentra ampliamente distribuido en regiones árticas, templadas y tropicales (Henrich, 2004), siendo más abundante en Europa, América del Norte y Asia (Goulson, 2010). Al igual que otras abejas, viven en colonias formadas por pocos a cientos de individuos y son en su mayoría eusociales, presentando solapamiento de generaciones, división de tareas y cuidado colectivo de la cría (Goulson 2010, Michener 1974).

Los abejorros presentan características morfológicas y comportamentales que los convierten en excelentes polinizadores (Goulson, 2010; Klein et al., 2007). Entre estas características se destacan: sus cuerpos grandes y pilosos, que facilitan el transporte de grandes cantidades de polen; su alta actividad en climas fríos, que les permite mantenerse activos cuando otros polinizadores no lo están; la capacidad de vibrar su musculatura alar para liberar el polen de ciertas flores; y la gran variabilidad en la longitud de sus probóscides, que les permite acceder a flores con corolas de distinta morfología. En este sentido son considerados abejas generalistas, dado que visitan un amplio número de angiospermas las cuales son polinizadas principal o exclusivamente por estos insectos (Goulson, 2010). También presentan valor como polinizadores de cultivos de interés agrícola mejorando la cantidad y calidad de frutos y semillas (Aizen et al., 2009; Klein et al., 2007). Para ésto, miles de colonias son criadas y comercializadas mundialmente (Velthuis, 2002). A nivel nacional, han sido reportados como polinizadores exitosos para la producción de semillas de trébol rojo (*Trifolium pratense*), así como de frutos como zapallito (*Cucurbita maxima*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y melón (*Cucumis melo*) (Ramos et al., 2023; Salvarrey et al., 2017, 2020).

1.2 Especies presentes en Uruguay

Uruguay cuenta con la presencia de dos especies nativas, *Bombus pauloensis* (=Syn *B. atratus*) y *Bombus bellicosus* (Salvarrey, 2019a, 2019b; Santos et al., 2017) (Figura 1). La primera, cuya distribución abarca todo el territorio nacional, presenta dos polimorfismos, uno melánico (cuerpo todo negro) y uno flavínico (cuerpo negro con bandas amarillas). Por otra parte, *B. bellicosus* tiene una distribución restringida al sur del Río Negro, presentando coloración característica negra y amarilla (Santos et al., 2017)

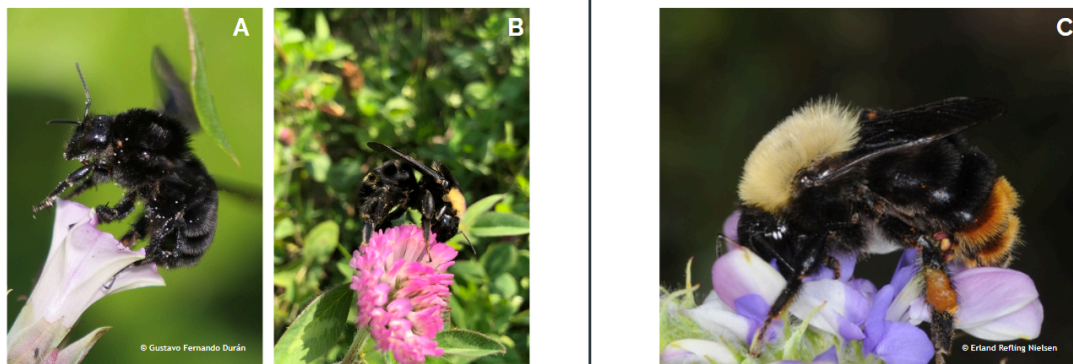


Figura 1. Especies de abejorros nativos presentes en Uruguay: (A) *B. pauloensis* de polimorfismo melánico, (B) *B. pauloensis* de polimorfismo flavínico, (C) *B. bellicosus*.

1.3 Ciclo de vida

Los abejorros presentan un ciclo de vida anual que comienza a principios de la temporada cálida, en primavera (agosto-setiembre), cuando una reina fecundada emerge de su estado de hibernación y busca un sitio adecuado para anidar. Generalmente eligen sitios sobre o bajo la superficie del suelo, aprovechando en algunos casos huecos de troncos de árboles y nidos abandonados de otros animales (aves o roedores) (Michener, 2007; Sladen, 1912). En esta etapa, la reina realiza todas las funciones necesarias para la construcción del nido, el que comienza con la elaboración de una vasija de cera, que utilizará como reservorio

para el néctar que recolecta (Michener, 2007). Con el otro recurso colectado, el polen, realiza un montículo y es sobre éste que ocurre la oviposición, presentando en cada puesta un número de huevos que varía entre 8 y 16 (Goulson, 2010). De esta forma se da el desarrollo de los nuevos individuos, el cual ocurre en contacto con la fuente de alimento (Sladen, 1912). En condiciones normales, la primera camada de huevos (diploides) dará lugar a obreras, las cuales se encargarán de todas las tareas que anteriormente realizaba la reina, mientras ésta, se dedicará casi exclusivamente a la puesta de huevos. Las colonias continúan así su crecimiento y desarrollo, llegando a un óptimo poblacional en verano (enero-febrero), donde pueden alcanzar una población de cientos de individuos (Goulson, 2010). A principios de otoño (marzo-abril), se realiza un cambio en la producción de individuos sexuales, dando lugar al desarrollo de nuevos machos a partir de huevos sin fertilizar (haploides) o a nuevas reinas a partir de huevos fertilizados (diploides). Estos nuevos individuos al poco tiempo de su emergencia, abandonan la colonia y se aparean. Culminada esta etapa las reinas fecundadas desarrollan reservas de grasa y buscan lugar adecuado para hibernar, mientras que los machos y obreras mueren. Las reinas permanecerán en este estado hasta comenzar un nuevo ciclo (Goulson, 2010).

Las especies de abejorros existentes pueden clasificarse en dos grupos según cómo las obreras alimentan las larvas. Los “hacedores de bolsillos”, por un lado, construyen estructuras de cera (similares a un bolsillo) a un costado del grupo de larvas en crecimiento, los cuales son utilizados para depositar directamente el polen colectado por las obreras y dejar a disposición de la cría (Sladen, 1912). Por otro lado, los denominados “almacenadores de polen” también construyen vasijas de cera en las que depositan el polen colectado, pero a diferencia de los anteriores, estas no se encuentran en contacto con el grupo de larvas, además de que también es necesario que las obreras tomen nuevamente este polen para alimentar a las larvas por regurgitación (Goulson, 2010).

1.4 Cría en cautiverio

Desde mediados de los 80, promovidos por el potencial de los abejorros como polinizadores, y teniendo en cuenta su ciclo anual, comenzó el desarrollo de la técnica de cría en cautiverio con el fin de obtener colonias desestacionalizadas (Velthuis & Van Doorn, 2006). Numerosas limitaciones tuvieron que superarse en el proceso de domesticación incluyendo: diseños de recintos adecuados, condiciones adecuadas de la sala de cría, iniciación de las colonias, alimento y modo de alimentación, hibernación y apareamiento de reinas, entre otras. La práctica se centró casi exclusivamente en un pequeño número de especies generalistas y de amplia distribución, pertenecientes al grupo “almacenadores de polen”, que producen colonias numerosas y se adaptan bien a las condiciones de cautiverio (Velthuis & Van Doorn, 2006). En este sentido, *B. terrestris* (subgénero: *Bombus*) fue la especie más empleada en Europa y Asia y *B. impatiens* (subgénero: *Pyrobombus*) en Norteamérica. Otras especies comercializadas en menor medida fueron *B. lucorum*, *B. ignitus* y *B. occidentalis* (Velthuis & Van Doorn, 2006), también pertenecientes al subgénero *Bombus*. Las dos especies presentes en nuestro país, por el contrario, pertenecen al subgénero *Thoracobombus* y son “hacedoras de bolsillos”. Este grupo es considerado sub estudiado (Carnell *et al.*, 2020b) y presenta desafíos significativos para su cría en condiciones de cautiverio (Goulson, 2010). Uno de estos desafíos, radica en que el alimento depositado cerca del área de cría no es frecuentemente utilizado por las obreras para alimentar a sus larvas, por lo que el suministro se suele realizar de forma manual dentro de los bolsillos, por lo menos en las primeras etapas de cría (Ptáček, 2001, Velthuis & Van Doorn, 2006). Aun así, a pesar de estas dificultades, es posible criarlos en cautiverio (Carnell *et al.*, 2020c; Pacateque *et al.*, 2012; Ptáček *et al.*, 2015; Salvarrey *et al.*, 2013; Velthuis & Van Doorn, 2006). En América del Sur particularmente, han habido reportes exitosos en la cría de *B. pauloensis* tanto a pequeña escala en Colombia y Uruguay, como a escala comercial en Argentina (Riaño *et al.*, 2014; Salvarrey *et al.*, 2013, 2021). Para la

cría de *B. bellicosus*, solo se cuenta con experiencias nacionales (Salvarrey *et al.*, 2013)

1.5 Nutrición

Los abejorros se alimentan exclusivamente de polen y néctar, tanto los adultos como las larvas (Goulson, 2010; Michener, 2007) y obtienen de estos recursos los nutrientes necesarios para asegurar su supervivencia, desarrollo, funcionamiento inmunológico y reproducción (Carnell *et al.*, 2020a; Vaudo *et al.*, 2015).

El néctar aporta principalmente carbohidratos, además de agua, aminoácidos, enzimas, iones inorgánicos y compuestos secundarios de plantas (como fenoles y alcaloides). Tres azúcares son predominantes en el mismo: glucosa, fructosa y sacarosa, además de otros minoritarios que están presentes en cantidades ínfimas (Nicolson & Thornburg, 2007).

El polen es la fuente principal de proteínas y lípidos, además de aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas y metabolitos secundarios. Su calidad nutricional está determinada principalmente por el contenido de proteína y lípidos (Carnell *et al.*, 2020a; Vaudo *et al.*, 2016), así como por la concentración de 10 aminoácidos, los cuales han sido descritos como esenciales para abejas melíferas (de Groot, 1953).

La composición química del polen varía entre los distintos taxones de plantas (Campos *et al.*, 2008), y por más que se encuentra altamente conservada entre familias y géneros (Roulston *et al.*, 2000), puede presentar variaciones incluso dentro de una misma especie (Cardoza *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2009). Específicamente el porcentaje de proteína y lípidos pueden variar de 3 a 60 % y de 1 a 20 % respectivamente (Roulston *et al.*, 2000; Roulston & Cane, 2000). Entre los factores que determinan esta variación se encuentran las condiciones climáticas, la calidad del suelo y la susceptibilidad a patógenos (Willmer, 2011; Delph *et al.*, 1997). Por estos motivos las abejas generalistas deben enfrentarse a una alta variabilidad de nutrientes tanto entre como dentro de los distintos grupos botánicos para satisfacer sus requerimientos nutricionales (Carnell *et al.*, 2020a).

Particularmente, el polen de eucalipto (*Eucalyptus spp.*) presenta características químicas que hacen de este un buen modelo para estudiar el estrés nutricional en abejas melíferas (*Apis mellifera*). El mismo presenta un bajo porcentaje de lípidos, el porcentaje de proteína cruda disminuye a lo largo de la floración alcanzando valores bajos (inferiores al 20%) (Branchiccela *et al.*, 2019; Invernizzi *et al.*, 2011), y suele ser deficiente en el aminoácido isoleucina (Somerville *et al.*, 2001). Adicionalmente, estudios realizados en estos ápidos muestran que su estado sanitario disminuye cuando las colmenas se alimentan casi exclusivamente de polen de eucalipto (Branchiccela *et al.*, 2019; Invernizzi *et al.*, 2011, 2022; Mendoza *et al.*, 2013)

Diversos estudios han reportado que la nutrición en este grupo de insectos se relaciona con la fisiología, morfología y comportamiento tanto a nivel individual como colonial (Carnell *et al.*, 2020a), y tiene una estrecha relación con la supervivencia, el desarrollo y la reproducción (Nicolson, 2011; Vaudo *et al.*, 2015). Los mayores reportes de efectos nutricionales en abejorros provienen de especies modelo como son *B. terrestris* y *B. impatiens* utilizando tanto reinas colectadas de la naturaleza, así como micro colonias, formadas por pocas obreras y en ausencia de reinas (Carnell *et al.*, 2020a). Dichos estudios evalúan las etapas larvales de obreras, machos y reinas, así como los efectos en la población adulta. A partir de estos trabajos, se ha reportado que la calidad y cantidad de alimento, pueden afectar directamente múltiples parámetros en el desarrollo de las colonias como el tiempo de inicio de la oviposición (Ryder *et al.*, 2021), la puesta de huevos (Moerman *et al.*, 2015; Ryder *et al.*, 2021), el peso de las larvas y el consumo de alimento (Baloglu & Gurel, 2015; Tasei & Aupinel, 2008a), el tamaño (Rotheray *et al.*, 2017) y el peso corporal de las obreras (Watrobska *et al.*, 2020), la mortalidad (Tasei & Aupinel, 2008; Watrobska *et al.*, 2020), y el tiempo necesario para alcanzar un determinado número de obreras (Baloglu & Gurel, 2015). Específicamente en las reinas puede afectar tanto su tamaño y su peso (Tasei & Aupinel, 2008b), como su capacidad reproductiva, ya que el correcto desarrollo de los ovarios tiene alto costo energético (Vanderplanck *et al.*, 2014).

A su vez, las distintas especies de abejorros poseen requerimientos nutricionales cuantitativa y cualitativamente diferentes, dados por diversos factores entre los que se encuentra la historia de vida, el tamaño de la colonia, y las especies vegetales explotadas (Vaudo *et al.*, 2015).

En definitiva, el impacto de la nutrición en las distintas especies de abejas es algo complejo, y puede ser determinante para un correcto desarrollo.

1.6 Influencia de la nutrición en la condición sanitaria de los Apidae.

Entre los efectos más importantes que tiene una adecuada nutrición en los abejorros, también está el mantenimiento de una buena condición sanitaria. En este sentido, los abejorros, al igual que la mayoría de los insectos, son hospederos de diferentes grupos de organismos entre los que se encuentran patógenos, parásitos y parasitoides, algunos específicos del género y otros compartidos con otros ápidos, especialmente *A. mellifera* (Goulson, 2010; Plischuk *et al.*, 2017; Salvarrey *et al.*, 2021). Estos juegan un rol fundamental como controladores de las poblaciones de sus hospederos, pero a su vez pueden tener consecuencias devastadoras sobre los mismos (Schmid-Hempel, 2001).

Entre los patógenos más estudiados en abejorros, se encuentran los microsporidios del género *Nosema* (Arbulo *et al.*, 2015a; Plischuk *et al.*, 2017; Salvarrey *et al.*, 2021; Schmid-Hempel & Loosli, 1998). Los microsporidios son organismos unicelulares eucariotas que se desarrollan como parásitos intracelulares obligatorios, capaces de infectar vertebrados e invertebrados. Su ciclo de vida consta de una fase merogonia (fase proliferativa) y una fase esporogonia (fase de producción de esporas) (Franzen, 2008). La espora, una célula altamente organizada que actúa como estructura de resistencia, representa la única etapa del ciclo de vida que es viable fuera de la célula hospedera (Keeling & Fast, 2002). En abejas, *Nosema spp.* infecta individuos adultos mediante la ingesta de alimentos contaminados con esporas. Éstas germinan en el intestino de

forma explosiva (Higes *et al.*, 2007) y mediante una extensión de una estructura especializada, llamada tubo polar, inyectan el esporoplasma infeccioso en el citoplasma de las células epiteliales. Este esporoplasma a su vez es capaz de dividirse y multiplicarse dentro de la célula, produciendo esporoblastos que maduran en gran cantidad de esporas. Estas se liberan al ambiente o infectan células vecinas, lo que confiere a estos patógenos un enorme potencial reproductivo (Han & Weiss, 2017).

Dentro del género, han sido identificadas principalmente tres especies capaces de infectar abejas corbiculadas: *Nosema apis*, *Nosema ceranae* y *Nosema bombi* (Arbulo *et al.*, 2015; Cameron *et al.*, 2011; Otti & Schmid-Hempel, 2008).

Nosema apis solo se ha reportado en abejas melíferas hasta el momento (Babin *et al.*, 2022) mientras que *N. ceranae* se ha reportado tanto en abejas como en abejorros (Arbulo *et al.*, 2015; Plischuk *et al.*, 2009; Salvarrey *et al.*, 2021). A nivel individual, la infección por *Nosema* causa desórdenes intestinales que provocan deficiencia en la asimilación de nutrientes y envejecimiento precoz, disminuyendo la vida media de la abeja (Alaux *et al.*, 2011; Higes *et al.*, 2007; Fries, 1993; Liu, 1984). Además, *N. ceranae* puede generar alteraciones en la producción de feromonas (Dussaubat *et al.*, 2010), en los niveles de azúcares presentes en la hemolinfa (Mayack & Naug, 2010) y en la composición de la microbiota intestinal (Castelli *et al.*, 2020; 2022). También es capaz de deprimir la respuesta inmune en las abejas aumentando la susceptibilidad a otros patógenos (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012) y se ha observado que un adecuado estado nutricional es clave para disminuir los daños causados (Branchiccela *et al.*, 2019; Castelli *et al.*, 2020; 2022). A nivel colonial, genera una reducción significativa de su población, llegando incluso a causar la muerte de la colonia (Higes *et al.*, 2009).

Nosema bombi, por otro lado, se ha descrito en diversas especies europeas de abejorros (Tay *et al.*, 2005) y norteamericanas (Cameron *et al.*, 2011), tanto criados comercialmente (Graystock *et al.*, 2013) como en abejorros silvestres (Cordes *et al.*, 2012). Sin embargo, no ha sido descrito en Sudamérica (Arbulo, 2015) ni en *Apis* (Babin *et al.*, 2022). En *B. terrestris*, la infección por este patógeno disminuye la aptitud de las colonias naturales, lo que parece dificultar la

inversión en reproducción de una colonia infectada (Otti & Schmid-Hempel, 2008). A su vez, en condiciones individuales, genera una reducción en la supervivencia de las obreras (Otti & Schmid-Hempel, 2007).

Desde hace algunos años a nivel mundial se registra una disminución de las poblaciones de diferentes especies de abejas entre las que se encuentran varias especies de abejorros. Las causas de este problema se asocian principalmente a factores antropogénicos entre los que se destacan la intensificación de la agricultura, el incremento en el uso de pesticidas, fragmentación de hábitats, introducción de especies exóticas y poca disponibilidad de recursos alimenticios, que tienen como consecuencia una mayor susceptibilidad de los insectos frente a patógenos y parásitos (FAO, 2020; Goulson *et al.*, 2015). En este sentido, en nuestro país, así como en otras regiones, se han reportado importantes pérdidas anuales de colmenas de abejas melíferas, con valores próximos al 30% (Requier *et al.*, 2024; Antunez 2016). Estas pérdidas, junto con otras causantes, se asocian a la infección por *Nosema* (Invernizzi *et al.*, 2022, Antunez 2016). En Uruguay, *N. ceranae* fue reportado con un alto grado de prevalencia para *B. pauloensis* y *B. bellicosus* con una media de 72% y 63% respectivamente (Arbulo *et al.*, 2015). Posteriormente, se encontró una prevalencia de 18% y 44% para estas especies (Plischuk *et al.*, 2017). Recientemente, Salvarrey *et al.* (2021) analizaron la prevalencia de distintos patógenos en abejorros nativos recolectados en el campo, así como obtenidos en el laboratorio. La prevalencia de *N. ceranae* fue mayor en las obreras silvestres (45,9%) que en las obtenidas mediante cría artificial (13%). Como una posible explicación se plantea que las obreras recolectadas en el campo, al compartir vectores de patógenos con otros polinizadores, como son las flores, podrían estar más expuestas a estos parásitos.

El presente trabajo busca aportar información respecto a las implicancias que tienen distintas dietas, en el desarrollo y en la sanidad de las especies de abejorros nativas de Uruguay. Abordar estos aspectos permite generar nuevos reportes en la cría de especies hacedoras de bolsillos, contribuyendo a la utilización de estas como modelos de estudio.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

2.1 Hipótesis

La diversidad de pólenes presente en las dietas suministradas, asociadas a su composición nutricional, afectan parámetros en el desarrollo y en la sanidad de las colonias de *B. pauloensis* y *B. bellicosus*. Específicamente se propone que una dieta de polen menos diversa y con menor contenido de proteína cruda y lípidos, afecta negativamente el desarrollo y la sanidad de las colonias en ambas especies.

2.2 Objetivo general

Evaluar el impacto de dos tipos de dietas de polen (monofloral y polifloral) en el desarrollo postembrionario y en la sanidad de las colonias de *B. pauloensis* y *B. bellicosus* criadas en condiciones de cautiverio.

2.3 Objetivos específicos

Comparar el desarrollo de las colonias tanto de *B. pauloensis*, como de *B. bellicosus*, al ser criadas en condiciones de cautiverio bajo dos dietas de polen; una monofloral de *Eucalyptus grandis* y una dieta polifloral (con menor y mayor contenido de proteína cruda y lípidos respectivamente), en los siguientes parámetros:

- Inicio de la oviposición
- Emergencia de obreras
- Supervivencia de reinas
- Número de celdas de huevos, larvas y pupas
- Tiempo de desarrollo postembrionario
- Peso fresco de las obreras emergidas, y peso seco de la cabeza de las mismas
- Presencia de los microsporidios *N. ceranae*, *N. apis*, y *N. bombi*

A su vez se pretende comparar dichos parámetros, entre ambas especies, cuando son alimentadas con la misma dieta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en la sección Etología de Facultad de Ciencias en el año 2022, en el marco del proyecto “Efecto de la nutrición en la microbiota y sanidad de los abejorros nativos del género *Bombus*” (FCE_3_2020_1_162451), financiado por ANII.

3.1 Colecta de abejorros

Se colectaron un total de 112 reinas al emerger de su etapa de hibernación en primavera (entre el 6 y el 24 de septiembre de 2022), 60 pertenecientes a *B. pauloensis* y 52 a *B. bellicosus* en el departamento de Montevideo y sus inmediaciones. Las mismas fueron distribuidas aleatoriamente en dos tratamientos resultando en cuatro grupos: 1) *B. pauloensis* con dieta monofloral (MP) (n = 29), 2) *B. pauloensis* con dietas polifloral (PP) (n = 31), 3) *B. bellicosus* con dieta monofloral (MB) (n = 26) y 4) *B. bellicosus* con dieta polifloral (PB) (n = 26)

3.2 Tipos de dietas

Se establecieron dos dietas de polen con composiciones nutricionales diferentes: una monofloral, proveniente principalmente de eucalipto (*Eucalyptus grandis*), y otra polifloral, proveniente de diversos recursos botánicos. El polen monofloral se obtuvo a partir de colmenas de *A. mellifera* emplazadas en forestaciones de *Eucalyptus grandis*, y presentó un contenido de proteína cruda del 16,15% y un porcentaje de lípidos del 1,11%. El polen polifloral por su parte, se colectó en diversos apiarios ubicados en diferentes zonas del país durante la primavera. El mismo presentó un contenido de proteína cruda del 21,83% y un porcentaje de

lípidos del 2,87%. En ambos casos el polen se obtuvo colocando trampas caza polen en colmenas de abejas melíferas (polen corbicular)

Los análisis palinológicos confirmaron el origen botánico de ambas muestras, verificando que el polen era efectivamente polifloral y monofloral. El porcentaje de proteínas de ambos tipos de polen se determinó mediante el método de digestión ácida de Kjeldahl (Arien *et al.*, 2015) en el Laboratorio de Nutrición Animal de INIA-La Estanzuela. A su vez, para evitar la transmisión de microorganismos, los pólenes fueron irradiados en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) con una dosis mínima de 19 kGy y máxima de 20 kGy.

3.3 Cría en cautiverio

Luego de colectadas las reinas, se dio inicio al proceso de cría en condiciones de laboratorio siguiendo la técnica descrita por Salvarrey *et al.* (2013). Cada reina fue colocada individualmente en una caja de madera y vidrio de 5x10x10 cm y alimentada con jarabe de sacarosa *ad libitum* (proporción agua y azúcar 1:1) y con una mezcla de polen (proporción polen y jarabe 15:1) de 8 g (Figura 2).

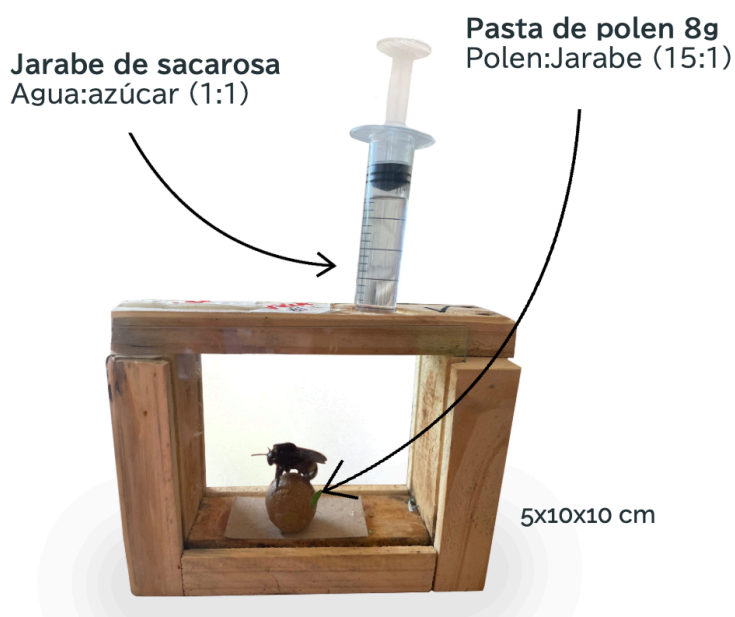


Figura 2. Cajas de inicio diseñadas para las primeras etapas de desarrollo de las colonias de abejorros.

Las cajas de inicio fueron colocadas en una estufa a 27-28°C y 40-60% de humedad relativa, de forma de simular las condiciones naturales de las colonias.

Cada 2-3 días se realizó un recambio de jarabe por jarabe fresco y se inspeccionó individualmente cada caja de cría, registrándose los siguientes parámetros: consumo de jarabe (ml), día de inicio de la oviposición y número de obreras (vivas y muertas).

Cuando aparecían los bolsillos (Figura 3E), estos se rellenaban con la mezcla de polen. Para evitar contaminaciones durante la manipulación del alimento y para suministrarlo de forma cómoda, se utilizó una jeringa rellena con dicha mezcla para cada nido, en la que fueron registrados el peso inicial y final de cada una.

A los 40 días de iniciada la cría se identificaron y contaron los estadíos juveniles observados (Figura 3A) en cada colonia. Dicha caracterización fue realizada de acuerdo al siguiente criterio:

- Estadío de huevo: Celdas esféricas de color marrón oscuro, de diámetro no superior a los 0,7cm (Figura 3B).

- Estadío de larva: Celdas de mayor tamaño, de color uniforme, y generalmente con aparición de una estructura de cera en forma de bolsillo (Figura 3C).

- Estadío de pupa: Celdas con coloración más clara que las anteriores, cada una alojando a una pupa, en donde se pierde la estructura en forma de bolsillo (Figura 3D).

Una vez que los nidos tuvieron más de 6 individuos fueron transferidos a una caja de mayor tamaño de 23x29x15 cm.

El total de obreras nacidas de cada uno de los nidos fueron pesadas individualmente. Posteriormente, se extrajeron las cabezas de 33 obreras por cada especie y tratamiento y se secaron individualmente en una estufa a 60°C por cuatro días, donde se registró su peso seco utilizando una balanza analítica (Alarcón, 2023). Este parámetro en particular, se utiliza como indicador de desarrollo de las glándulas hipofaríngeas en abejas melíferas. Dichas glándulas, exclusivas de los himenópteros, se ubican dentro de la cabeza (Hrassnigg & Crailsheim, 1998) y se ha observado que su desarrollo puede ser influido por la calidad nutricional del polen (Ahmad *et al.*, 2021).

Las colonias se mantuvieron por un periodo de 81 días, momento en el cual se extrajeron 3 obreras y las respectivas reinas de 44 nidos con el fin de analizar su microbiota (excede el alcance de esta tesis). Motivo por el cual éste fue el momento de finalización de este estudio.

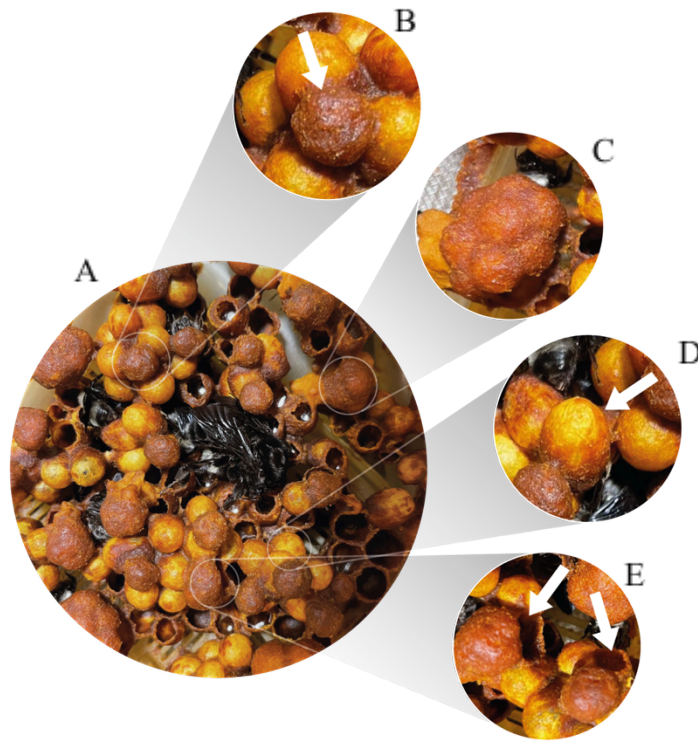


Figura 3. Vista de la estructura de la colmena de *B. pauloensis* con su reina (A), estadíos de huevos (B), larvas (C), pupas (D) y bolsillos (E) .

3.4 Identificación de especies de *Nosema*

Para asegurar una detección precisa de los microsporidios en las muestras de *Bombus spp.*, se emplearon métodos basados en el análisis de ADN. A través de la extracción de ADN de las muestras, es posible identificar la presencia del patógeno mediante la amplificación de regiones genéticas específicas utilizando técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este enfoque basado en el ADN no solo mejora la sensibilidad de la detección, sino que también permite confirmar la identidad de los microsporidios a nivel genético,

proporcionando una mayor certeza en los resultados obtenidos. Dichos análisis moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Salud de las Abejas del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Con el objetivo de determinar la presencia de los microsporidios *N. ceranae*, *N. apis* y *N. bombi*, se seleccionaron 11 colonias por tratamiento, de los que se colectaron 3 obreras y su reina. Dichas obreras fueron extraídas una vez que cumplieron al menos 7 días como adultas (Higes *et al.*, 2007).

3.4.1 Extracción de ADN

Los abejorros extraídos se esterilizaron superficialmente usando una solución de hipoclorito al 1% (Engel *et al.*, 2013). Se extrajeron los intestinos de forma individual en condiciones asépticas y se homogeneizaron usando perlas de cerámica en tubos de plástico empleando un equipo FastPrep-24™ durante 40 segundos a 6,0 m/s. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 1 min a 5000 xg. La extracción de ADN se realizó utilizando el método de SDS-CTAB (Zhou *et al.*, 1996). El ADN obtenido se cuantificó y se normalizó a 10 ng/μL.

3.4.2 Amplificación de ADN mediante PCR.

Para la detección de *N. ceranae* y *N. apis* en estas muestras, se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 18S mediante el ensayo de PCR multiplex, de acuerdo con lo descrito por Martín-Hernández *et al.*, 2007. En este ensayo se utiliza un juego de cebadores específico para la detección de cada microsporidio. En cada reacción de PCR se trabajó con un volumen reacción de 50μl conteniendo 3μl de MgCl₂ 3mM, 5μl de buffer PCR 10X, 0,4μl Taq ADN polimerasa (5U/μl), 2μl de 0,4mM de dNTPs, 40μM de cada cebador correspondiente a *N. ceranae* y a *N. apis* y 5μl de ADN molde. El resto del volumen se completó con agua destilada estéril. Mediante el uso del primer par de cebadores *N. apis* forward 5'-GGG GGC ATG TCT TTG ACG TAC TAT GTA- 3' y

N. apis reverse 5'-GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA ACA ACT ATG-3' se obtiene un amplicón de 321 pares de bases (pb) en *N. apis*, mientras que con el par *N. ceranae* forward 5'-CGG CGA CGA TGT GAT ATG AAA ATA TTA A- 3' y *N. ceranae* reverse 5'-CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA AAC CG- 3' se obtiene un amplicón de 218-219 pb en *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007). El protocolo empleado para el PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94°C durante 2 minutos, seguido por 10 ciclos de 94°C durante 15 minutos, 61,8°C durante 30 segundos y 72°C por 45 segundos. Luego se agregan 20 ciclos más del anteriormente descrito, pero se van adicionando 5 segundos al último paso de cada uno de los 20 ciclos. Y, por último, una extensión final de 72°C por 7 minutos. Dichas amplificaciones se realizaron empleando un termociclador Labnet™ MultiGene™ OptiMax. En cada corrida de PCR se le añadieron controles positivos para *N. ceranae* y para *N. apis* y un control negativo (donde no se incorporó ADN).

Paralelamente para la detección de *N. bombi* se amplificó una región del gen 18S que codifica la subunidad pequeña de ARN ribosomal (SSU-rRNA). En cada reacción de PCR se trabajó con un volumen reacción de 50 µl conteniendo 3µl de MgCl₂ 3mM, 5µl de buffer PCR 10X, 0,4µl Taq ADN polimerasa (5U/µl), 2µl de 0,4mM de dNTPs, 0,8µM de cada cebador correspondiente a *N. bombi* y 5µl de ADN molde. El resto del volumen se completó con agua destilada estéril empleando los cebadores forward BombicarFw: 5'-GGC CCA TGC ATG TTT TTG AAG ATT ATT AT-3' y reverse BombicarRv: 5'-CTA CAC TTT AAC GTA GTT ATC TGC GG-3', con los cuales se obtuvo un amplicón de 101 pb (Plischuk *et al.*, 2009). Dichas amplificaciones se realizaron empleando un termociclador Labnet™ MultiGene™ OptiMax. En cada corrida de PCR se le añadió un control positivo para *N. bombi* y un control negativo (donde no se incorporó ADN).

Para realizar dichas amplificaciones, se utilizó un volumen final de ADN compuesto por 4 µl ADN de cada una de las tres obreras seleccionadas de cada colonia, las cuales se unificaron en un “pool”, obteniéndose así 44 muestras

compuestas. En aquellos casos donde la detección diera positivo, se realiza un nuevo análisis considerando dichas obreras de forma individual.

3.4.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en TBE 0.5X (Tris 10.8 g, ácido bórico 5.5 g, EDTA 0.5 M pH 8.4 ml por 100 ml), utilizando *Gene Ruler* Fermentas 1Kb como marcador de peso molecular, a 110 V. Posteriormente, los geles se tiñeron con GelRed®, visualizados mediante exposición a luz UV y fotografiados a través de una cámara Kodak (DC290).

3.5 Análisis de datos.

De acuerdo con la naturaleza de los datos, se seleccionaron distintos análisis. Para aquellos que cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas se realizaron análisis de varianza (ANOVA). Para comparaciones pareadas se utilizó la prueba estadística t. Para los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado, o la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente el test de Wilcoxon. Los datos se analizaron en el software R®.

La prevalencia de *N. ceranae*, *N. apis* y *N. bombi* se determinó como frecuencia de aparición.

4. RESULTADOS

4.1 Desarrollo de colonias

Del total de reinas colectadas de la especie *B. pauloensis* (n=60), e independientemente de la dieta suministrada, el 55% inició la oviposición. En el caso particular de la dieta monofloral (MP) un 48,2% tuvo éxito y para la dieta polifloral (PP) un 61,2%. Estas diferencias no resultaron significativas ($\chi^2=0,57$, $df=1$, $p=0,45$) (Figura 4).

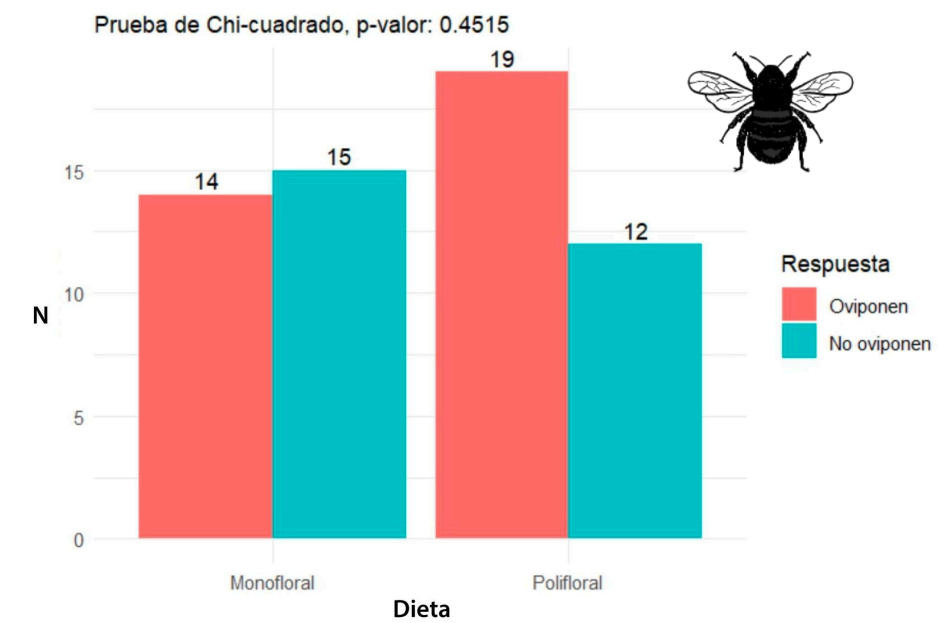


Figura 4. Número de reinas de la especie *B. pauloensis* que oviponen o no, según la dieta suministrada. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

Las reinas de la especie *B. bellicosus* (n=52), por su parte, tuvieron un porcentaje de éxito en el inicio de la oviposición de 56%. Siendo 61,5% y 50% para las dietas monofloral (MB) y polifloral (PB) respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ($\chi^2=0,31$, $df=1$, $p=0,58$) (Figura 5).

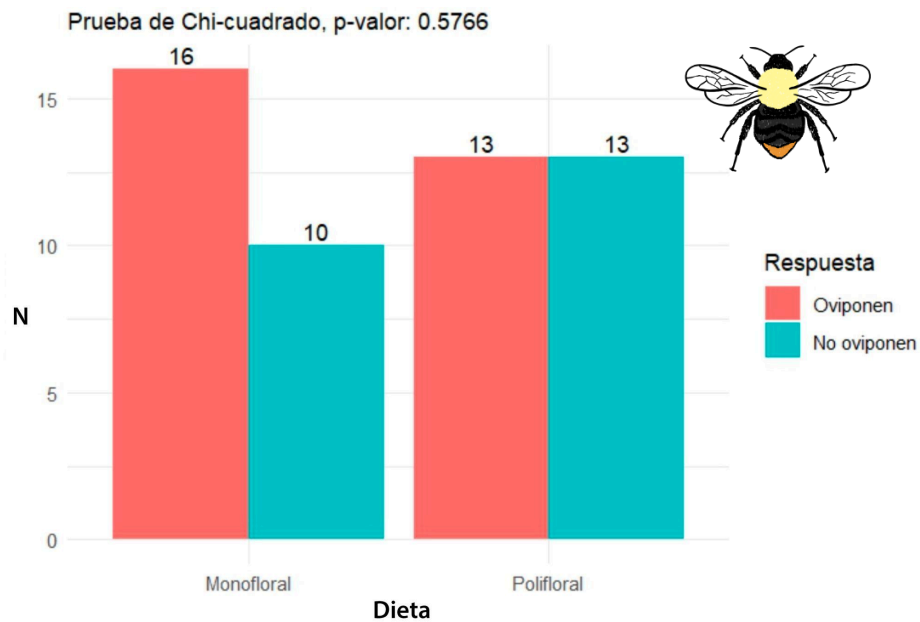


Figura 5. Número de reinas de la especie *B. bellicosus* que oviponen o no, según la dieta suministrada. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

La totalidad de reinas de la especie *B. pauloensis* alimentadas con polen monofloral (MP), que lograron iniciar la oviposición, alcanzaron a producir al menos una obrera. En cambio, el 73,7% de las reinas alimentadas con polen polifloral que lograron la oviposición, alcanzaron a producir al menos una obrera. No se encontraron diferencias en ambos grupos ($\chi^2=2,54$, $df= 1$, $p=0,11$) (Figura 6).

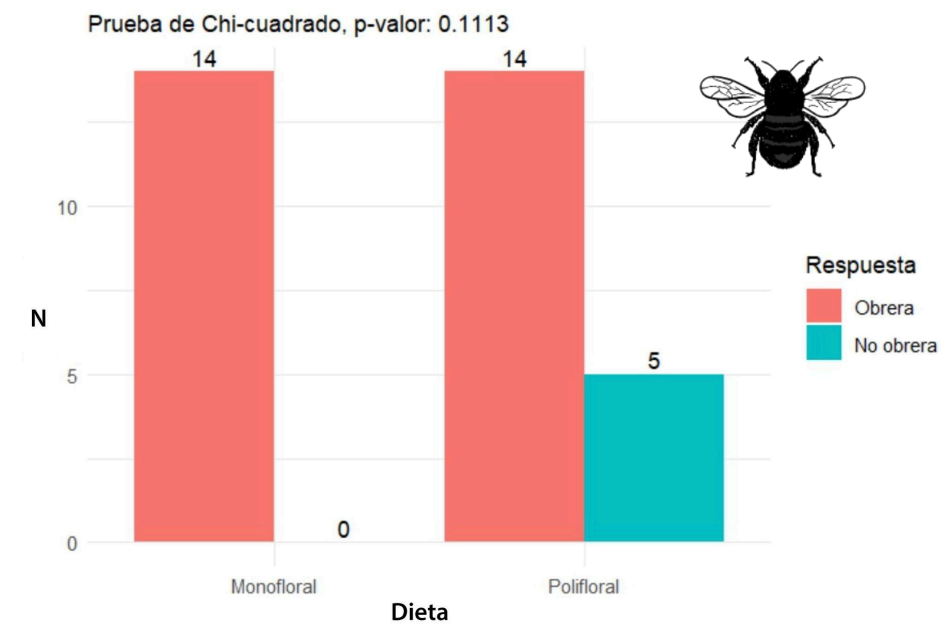


Figura 6. Número de reinas de la especie *B. pauloensis* que habiendo iniciado la oviposición, lograron o no lograron la emergencia de al menos una obrera según la dieta suministrada. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

El 87,5% de las reinas de la especie *B. bellicosus* alimentadas con polen monofloral (MB), que lograron iniciar la oviposición, alcanzaron a producir al menos una obrera. En cambio, el 100% de las reinas alimentadas con polen polifloral que lograron iniciar la oviposición, alcanzaron a producir al menos una obrera. No se encontraron diferencias en ambos grupos ($\chi^2=0,34$, $df= 1$, $p=0,56$) (Figura 7).

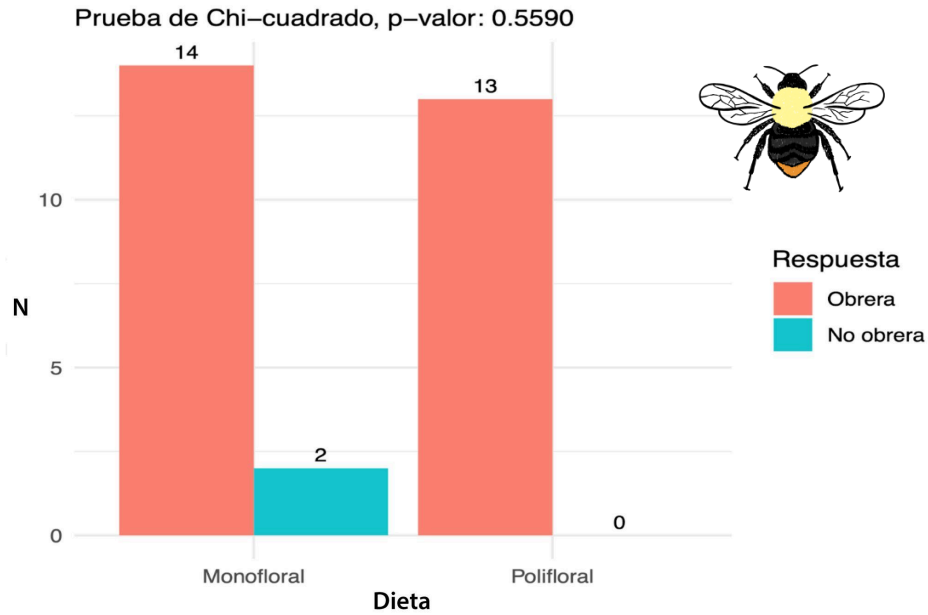


Figura 7. Número de reinas de la especie *B. bellicosus* que habiendo iniciado la oviposición, lograron o no lograron la emergencia de al menos una obrera según la dieta suministrada. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

En los primeros 10 días de cría se registró la mayor mortalidad de reinas, siendo para la especie *B. pauloensis* el 25% de las mismas. Para la dieta monofloral la mortalidad fue de un 31% mientras que para la dieta polifloral un 19,3%. No se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=0,56$, $df= 1$, $p=0,46$) (Figura 8).

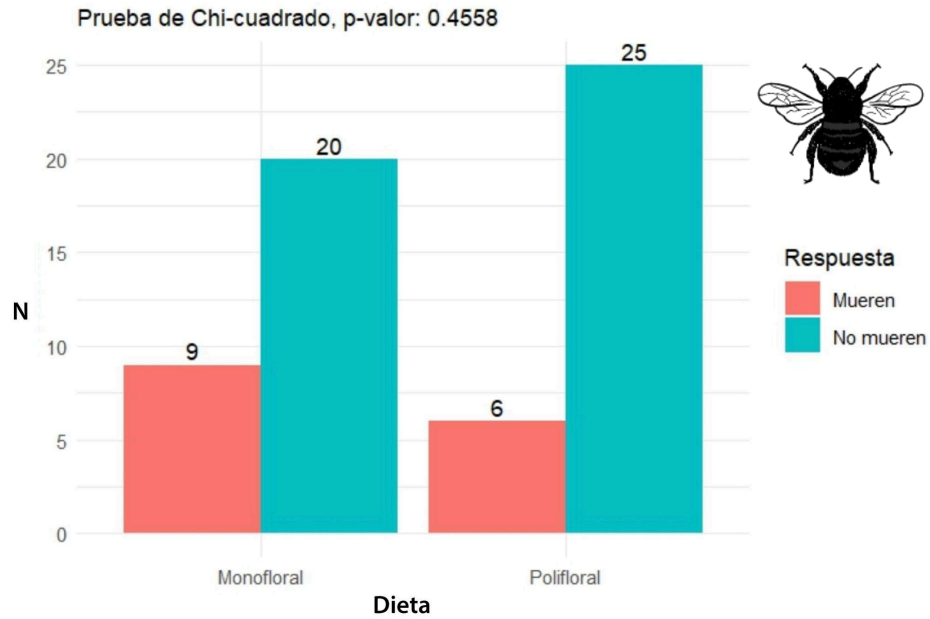


Figura 8. Número de reinas de la especie *B. pauloensis* que murieron, o no, antes de los 10 días de iniciada la cría, para ambas dietas suministradas. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

La especie *B. bellicosus* en este sentido, presentó una mortalidad del 19,2% en los primeros 10 días de cría, sin presentar diferencias entre las distintas dietas (ambas 19,2%) ($\chi^2=0$, $df=1$, $p=1$) (Figura 9).

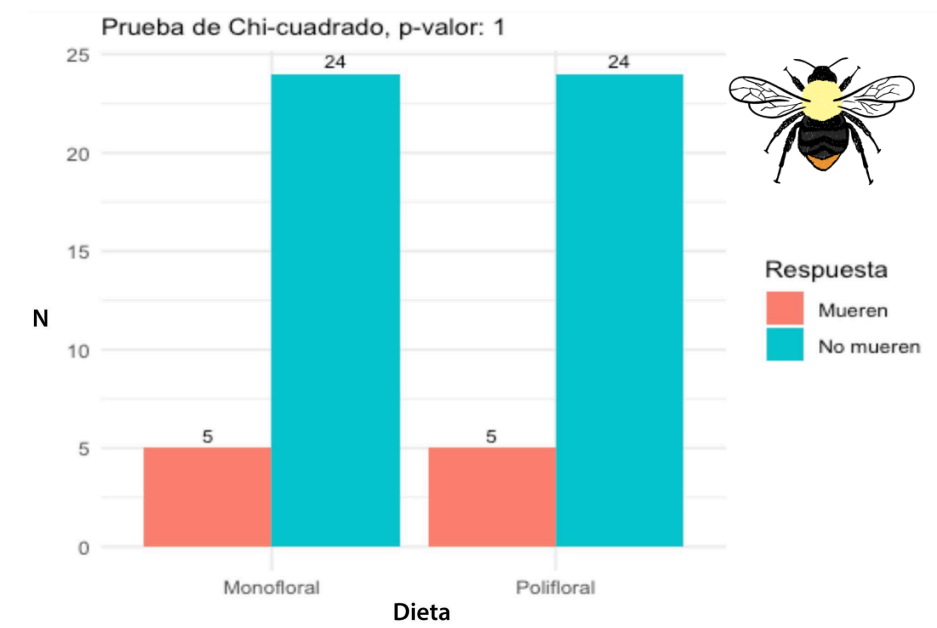


Figura 9. Número de reinas de la especie *B. bellicosus* que murieron o no, antes de los 10 días de iniciada la cría, para ambas dietas suministradas. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

4.2 Consumo de polen y jarabe

A partir de 32 nidos de la especie *B. pauloensis* y 30 de *B. bellicosus*, se obtuvo una estimación del suministro de polen y del consumo de jarabe por obrera en las colonias de cada especie. Únicamente fueron consideradas las obreras vivas que cada nido presentó en el último conteo.

Mediante esta técnica de cría, las colonias de la especie *B. pauloensis* demandaron en promedio 1,08 g de polen en sus bolsillos, y 12,33 ml de jarabe por obrera (n=210). Las colonias de *B. bellicosus*, por su parte, demandaron en promedio 0,85 g de polen y 11,03 ml de jarabe por obrera (n=214).

4.3 Tamaño de las colonias

A los cuarenta días de iniciada la cría, se contabilizaron y analizaron las celdas en los distintos estadios de desarrollo (huevos, larvas y pupas), el número de bolsillos, y la cantidad de obreras presentes en cada uno de los cuatro grupos.

El número de puestas para ambas especies y tratamientos varió entre $0,89 \pm 0,76$ huevos/colonia correspondiente al grupo (MB) y $1,36 \pm 1,0$ huevos/colonia correspondiente al grupo (PB). El número de larvas, por su parte, presentó una variación de $1,7 \pm 2,42$ larvas/colonia correspondiente al grupo (PB), a $3,5 \pm 3,49$ larvas/colonia correspondientes al grupo (MB), mientras que el número de pupas varió entre $1,24 \pm 2,2$ pupas/colonia (PB) y $2,15 \pm 2,68$ pupas/colonia (MP). Estas diferencias obtenidas no resultaron significativas en ninguno de los estadios analizados (Figura 10 A, B y C).

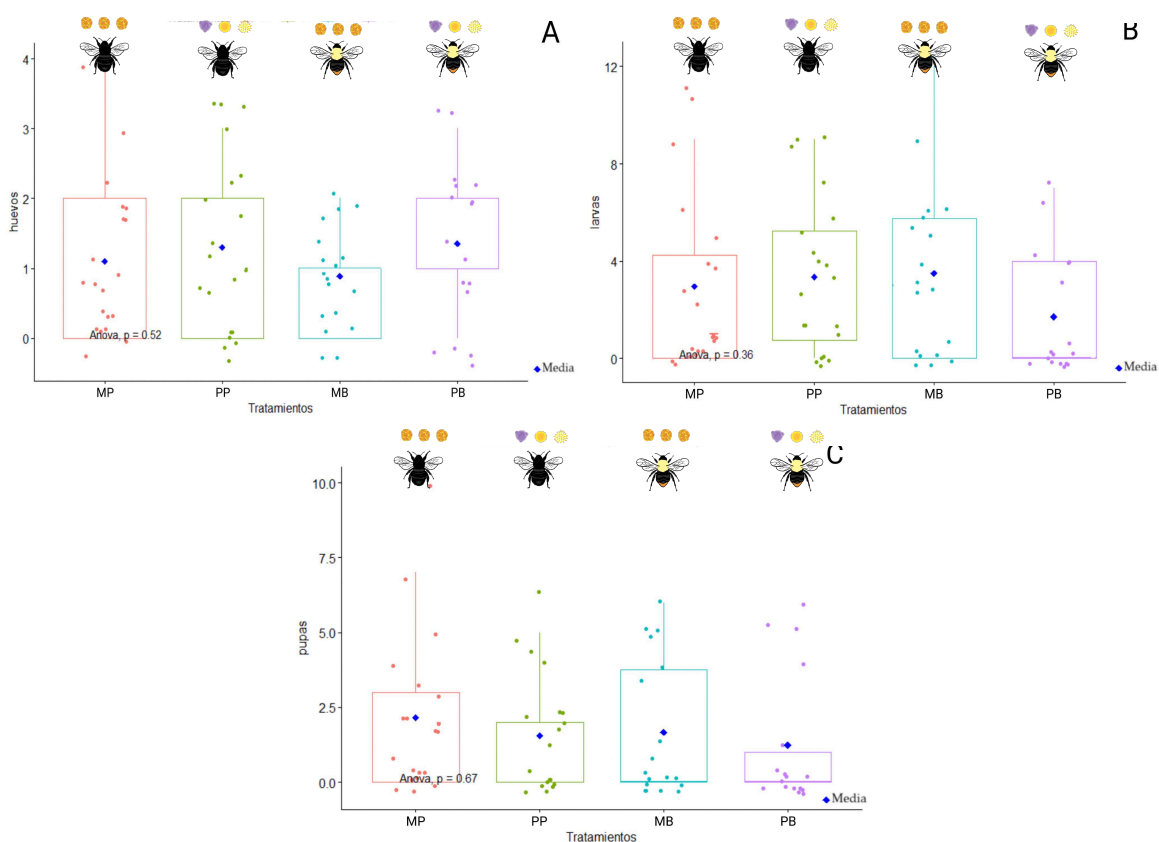


Figura 10. Efecto de las dietas suministradas en el número de puestas de huevos (A), larvas (B) y pupas (C) contabilizadas a los 40 días de iniciada la cría para ambas especies. MP: *B. pauloensis* con dieta monofloral; PP: *B. pauloensis* con dieta polifloral; MB: *B. bellicosus* con dieta monofloral y PB: *B. bellicosus* con dieta polifloral. Los resultados presentados en forma de box plot incluyen la media, los cuartiles 25 y 75%, valores outlier, máximos y mínimos. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

En igual sentido, el número de bolsillos contabilizados fue similar en ambas especies y dietas. La variación fue de $0,53 \pm 0,94$ “bolsillos”/colonia correspondientes al grupo (PB) a $1,5 \pm 1,57$ “bolsillos”/colonia correspondiente al grupo (MP) (Figura 11).

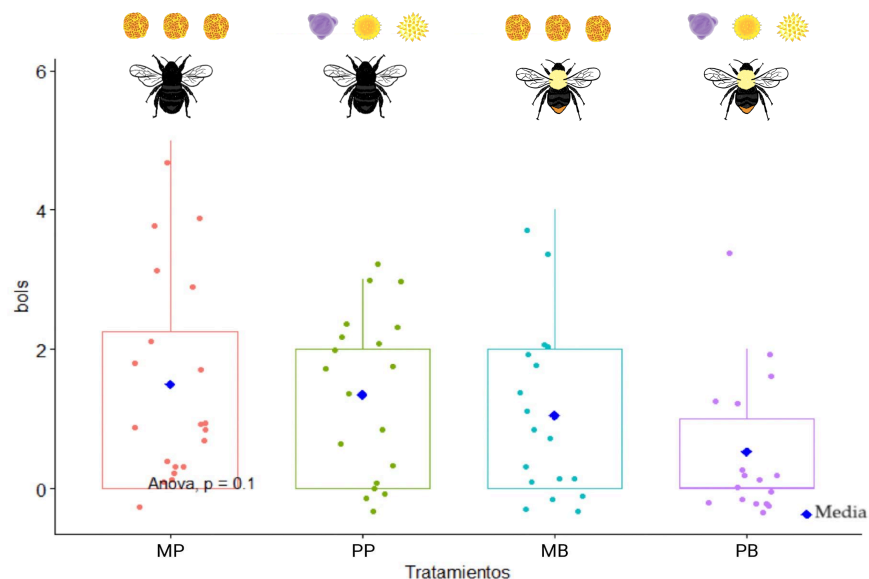


Figura 11. Efecto de las dietas suministradas en el número de “bolsillos” contabilizados a los 40 días de iniciada la cría para ambas especies. MP: *B. pauloensis* con dieta monofloral; PP: *B. pauloensis* con dieta polifloral; MB: *B. bellicosus* con dieta monofloral y PB: *B. bellicosus* con dieta polifloral. Los resultados presentados en forma de box plot incluyen la media, los cuartiles 25 y 75%, valores outlier, máximos y mínimos. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

Respecto al número de obreras, la dieta no resultó una variable significativa para ninguna de las especies. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas al comparar entre ambas especies alimentadas con la misma dieta, en donde el número de obreras fue mayor en *B. pauloensis* que en *B. bellicosus* tanto para la dieta monofloral ($p < 0,05$) como para la polifloral ($p < 0,05$) (Figura 12).

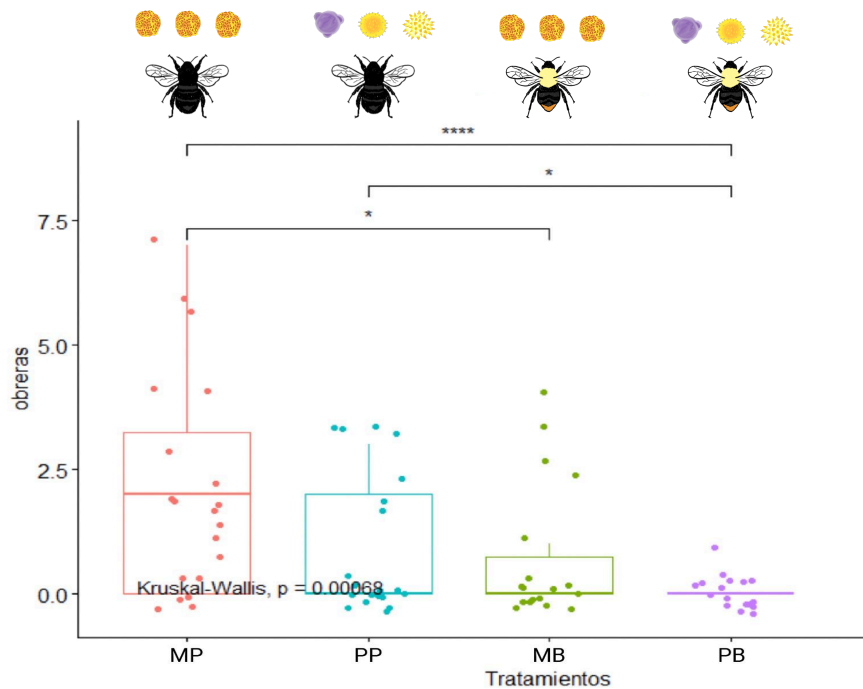


Figura 12. Efecto de la dieta suministrada para ambas especies y tratamientos en el número de obreras contabilizadas a los 40 días de iniciada la cría. MP: *B. pauloensis* con dieta monofloral; PP: *B. pauloensis* con dieta polifloral; MB: *B. bellicosus* con dieta monofloral y PB: *B. bellicosus* con dieta polifloral. Los resultados presentados en forma de box plot incluyen la mediana, los cuartiles 25 y 75%, valores outlier, máximos y mínimos. Se indican las diferencias significativas entre los diferentes grupos con una barra horizontal negra (*: p valor ≤ 0.05 , **: p valor ≤ 0.01 , ***: p valor ≤ 0.001).

4.4 Tiempo de desarrollo postembrionario

El tiempo transcurrido desde la oviposición hasta la emergencia de la primera obrera no presentó diferencias significativas entre las distintas especies alimentadas con las distintas dietas (Figura 13).

B. pauloensis presentó una media de $24,29 \pm 2,33$ días ($n=14$) para la dieta monofloral (MP) y $27,14 \pm 3,23$ días ($n=14$) para la dieta polifloral (PP). *B.*

bellicosus en cambio presentó una media de $27,38 \pm 4,79$ días ($n=13$) para la dieta monofloral (MB) y $28,23 \pm 3,81$ días ($n=13$) para la dieta polifloral (PB).

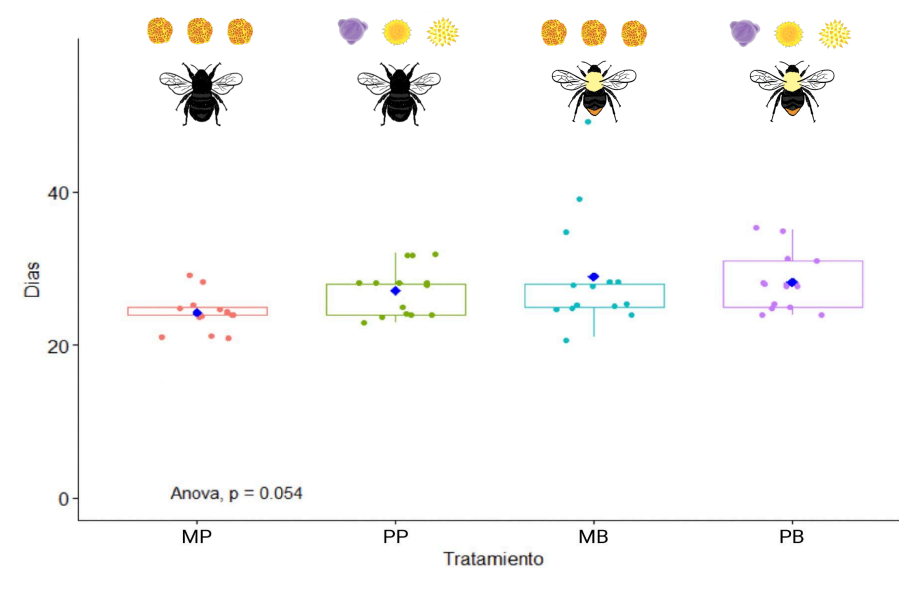


Figura 13. Tiempo de desarrollo postembrionario hasta la emergencia de la primera obrera bajo distintas dietas. MP: *B. pauloensis* con dieta monofloral; PP: *B. pauloensis* con dieta polifloral; MB: *B. bellicosus* con dieta monofloral; PB: *B. bellicosus* con dieta polifloral. Los resultados presentados en forma de box plot incluyen la media, los cuartiles 25 y 75%, valores outlier, máximos y mínimos. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

4.5 Peso fresco de las obreras emergidas.

Las obreras de la especie *B. pauloensis* alimentadas con polen monofloral presentaron pesos significativamente mayores ($0,15 \pm 0,05g$) ($n=104$) que las alimentadas con polen polifloral ($0,12 \pm 0,04g$) ($n=139$) ($p<0,0001$) (Figura 14). En cuanto a la especie *B. bellicosus* la dieta no provocó cambios en el peso de las mismas.

Al comparar los pesos de las obreras de las diferentes especies alimentadas con la dieta monofloral, las de *B. pauloensis* presentaron el mayor peso ($p < 0,001$), mientras que para ambas especies alimentadas con la dieta polifloral, no se observan diferencias significativas en el peso.

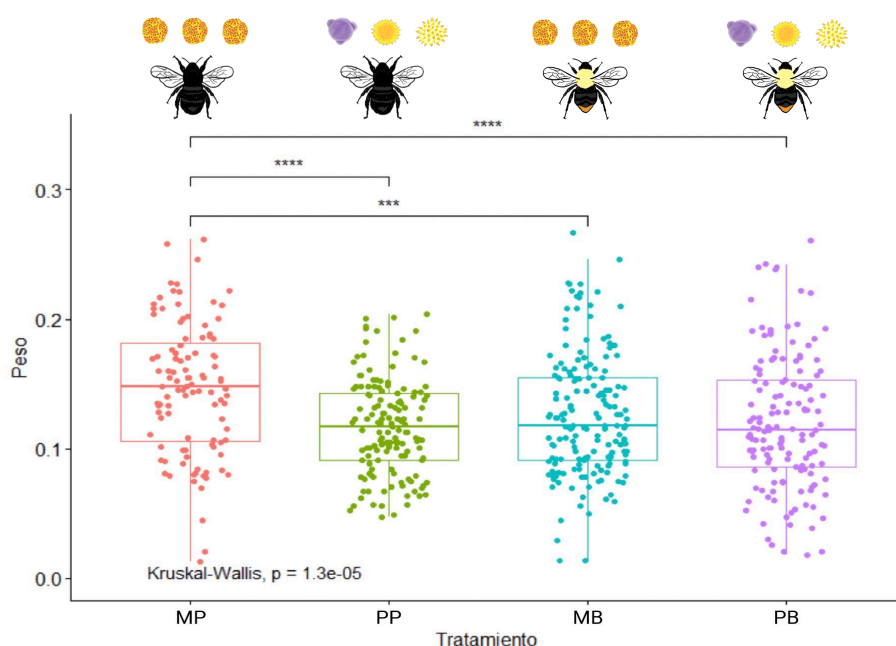


Figura 14. Peso fresco de las obreras emergidas de ambas especies bajo distintas dietas. MP: *B. pauloensis* con dieta monofloral; PP: *B. pauloensis* con dieta polifloral; MB: *B. bellicosus* con dieta monofloral y PB: *B. bellicosus* con dieta polifloral. Los resultados presentados en forma de box plot incluyen la mediana, los cuartiles 25 y 75%, valores outlier, máximos y mínimos. Se indican las diferencias significativas entre los diferentes grupos con una barra horizontal negra (*: p valor ≤ 0.05 , **: p valor ≤ 0.01 , ***: p valor ≤ 0.001).

4.6 Peso seco de la cabeza de las obreras.

Las obreras de la especie *B. pauloensis* alimentadas con dieta monofloral presentaron un peso seco de las cabezas significativamente mayor ($0,0062 \pm 0,0016g$) ($n=33$) con respecto a la misma especie alimentada con dieta polifloral ($0,0047 \pm 0,0010g$) ($n=33$) ($p<0,0001$) (Figura 15).

Las obreras de *B. bellicosus*, independientemente de la dieta, presentaron un peso seco de sus cabezas similar siendo ($28,23 \pm 3,81$)g ($n=33$) para la dieta polifloral y ($0,0057 \pm 0,015g$) ($n=33$) para la dieta monofloral.

Al comparar las diferentes especies alimentadas con la misma dieta, se puede ver que en la dieta monofloral los pesos de las cabezas no presentaron diferencias, mientras que entre las diferentes especies alimentadas con polen polifloral, *B. bellicosus* presentó significativamente el mayor peso ($p<0,01$).

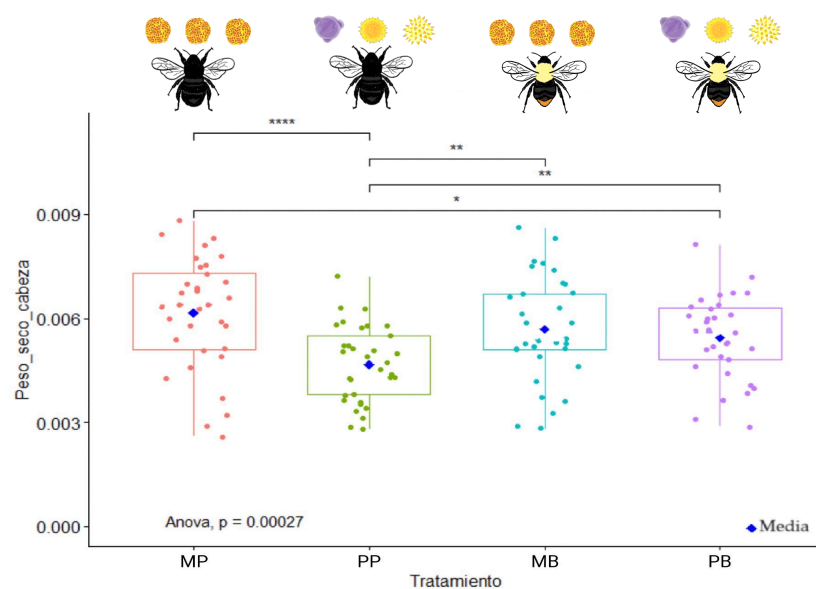


Figura 15. Peso seco de las cabezas de las obreras emergidas de ambas especies bajo distintas dietas. MP: *B. pauloensis* con dieta monofloral; PP: *B. pauloensis* con dieta polifloral; MB: *B. bellicosus* con dieta monofloral y PB: *B. bellicosus* con dieta polifloral. Los

resultados presentados en forma de box plot incluyen la media, los cuartiles 25 y 75%, valores outlier, máximos y mínimos. Se indican las diferencias significativas entre los diferentes grupos con una barra horizontal negra (*: p valor ≤ 0.05 , **: p valor ≤ 0.01 , ***: p valor ≤ 0.001).

4.7 Detección de microsporidios *Nosema ceranae*, *Nosema apis* y *Nosema bombi*

Del total de *pools* de obreras analizados (n=44) únicamente uno de ellos correspondiente a la especie *B. pauloensis* con dieta monofloral (MP) resultó positivo (Figura 16, Carril 39), donde el amplicón de 218 pb obtenido coincide con el tamaño esperado para *N. ceranae*.

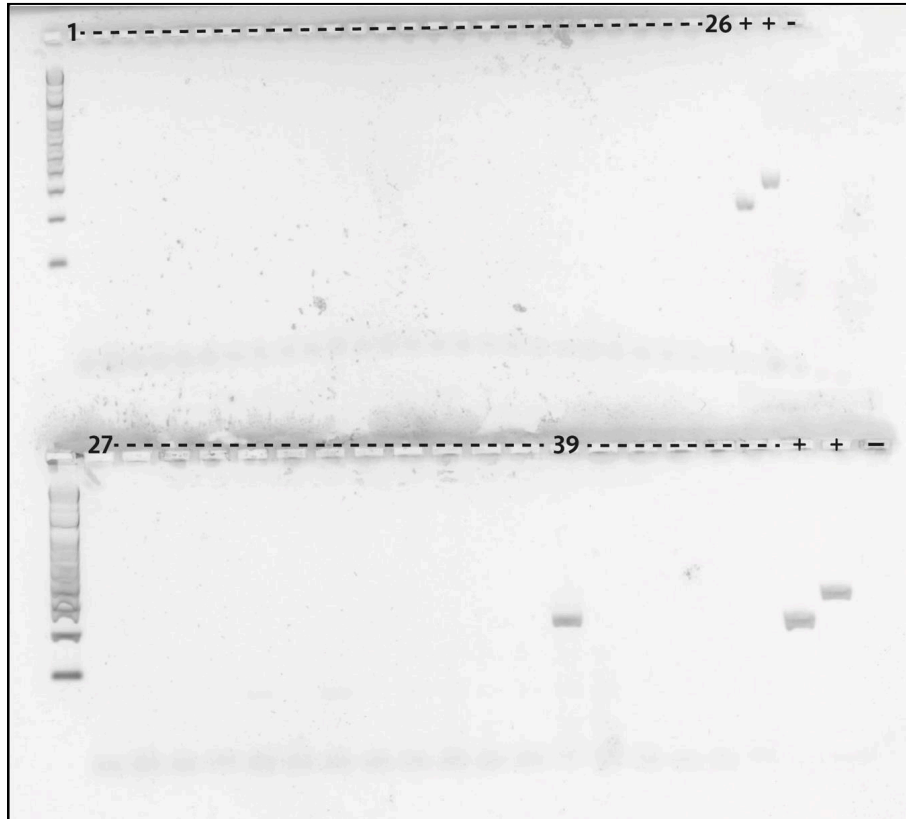


Figura 16. Amplificación de fragmentos del gen ARNr 18S de *N. ceranae* y *N. apis* utilizando cebadores específicos para estos microsporidios. Se demuestra el marcador de peso molecular en el primer carril. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 280 pb y el de *N. apis* en 321 pb.

Carriles: 1-PB4 2-PB5 3-PB6 4-PB7 5-PB8 6-PB12 7-PB13 8-PB19 9-PB2 10-PB2 11-PB26 12-PP1 13-PP2 14- PP7 15- PP9 16- PP11 17- PP15 18-PP16 19-PP21 20-PP27 21-PP28 22-PP30 23-MB1 24-MB3 25-MB4 26-MB6 27-MB8 28-MB10 29-MB12 30-MB13 31-MB14 32-MB17 33-MP3 34-MP4 35-MP9 36-MP12 37-MP13 38-MP14. 39-MP15 40-MP22 41-MP23 42-MP24 43-MP25 44-MP28 +- Control positivo *N. ceranae* +- Control positivo *N. apis* - Control negativo

Al analizar las muestras de dicha colonia individualmente de acuerdo con lo descrito, resultaron positivas únicamente dos de las tres obreras analizadas (Figura 17, carriles 2, 3), y su reina (Figura 17: carril 4), no así las demás reinas ni obreras analizadas.

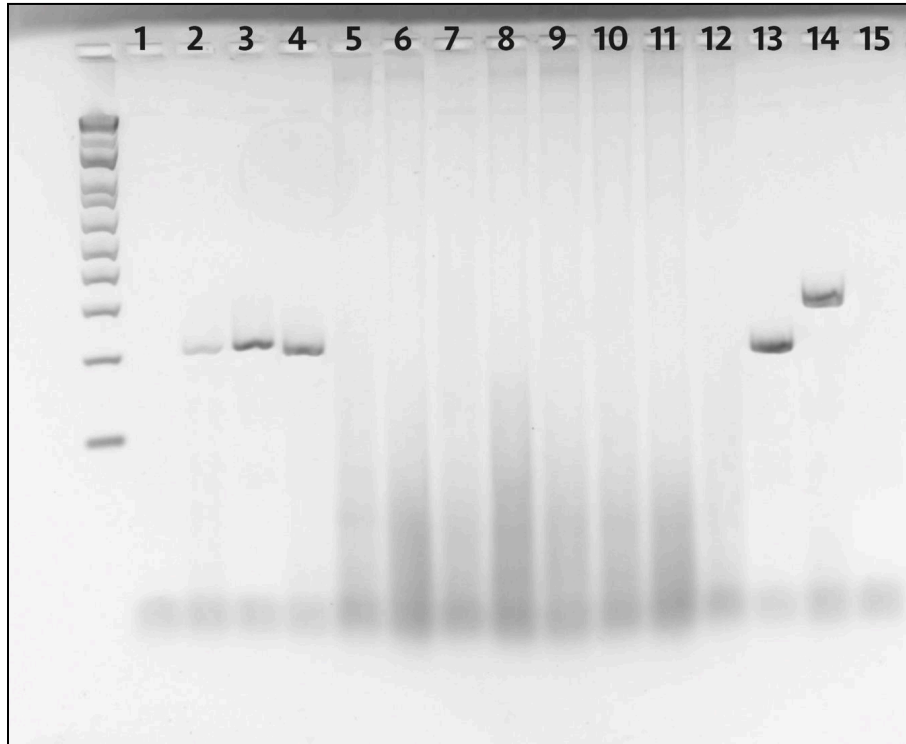


Figura 17. Amplificación de fragmentos del gen ARNr 18S de *N. ceranae* y *N. apis* utilizando cebadores específicos para estos microsporidios. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 280 pb y el de *N. apis* en 321 pb.

Carriles: **1-** MP15 obrera 1 **2-** MP15 obrera 2 **3-** MP15 obrera 3 **4-** MP15 reina **5-** Reina MP3 **6-** Reina MP4 **7-** Reina MP9 **8-** Reina MP12 **9-** Reina MP13 **10-** Reina MP24 **11-** Reina MP28 **12-** Reina MB1 **13-** Control positivo *N. ceranae* **14-** Control positivo *N. apis* **15-** control negativo.

No fue detectada la presencia de *N. apis* ni *N. bombi* en ninguna de las muestras analizadas, tanto de obreras como de reinas. (Figura 18; Material suplementario)

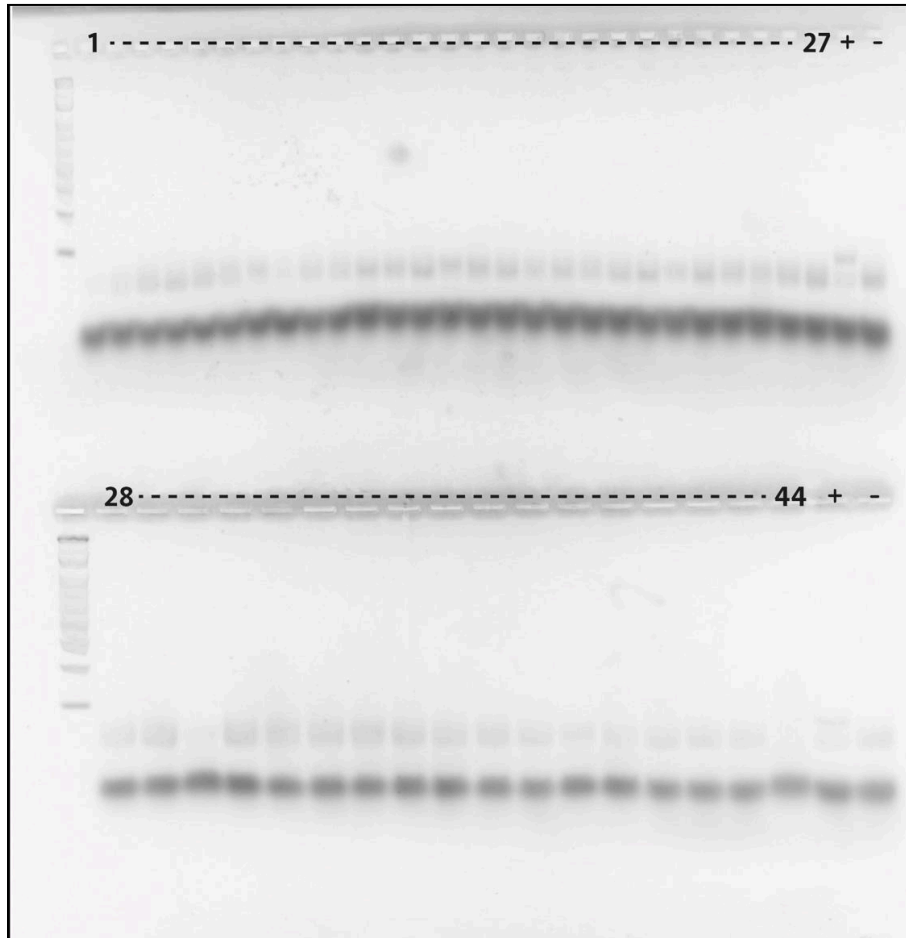


Figura 18. Amplificación de fragmentos del gen ARNr 18S de *N. bombi* utilizando cebadores específicos para este microsporidio. El fragmento amplificado para *N. bombi* se estimó en 101 pb.

Carriles: 1- PB4 2- PB5 3- PB6 4- PB7 5- PB8 6- PB12 7- PB13 8- PB19 9- PB20 10- PB21 11- PB26 12- PP1 13- PP2 14- PP7 15- PP9 16- PP11 17- PP15 18- PP16 19- PP21 20- PP27 21- PP28 22- PP30 23- MB1 24- MB3 25- MB4 26- MB6 27- MB8 28- MB10 29- MB12 30- MB13 31- MB14 32- MB17 33- MP3 34- MP4 35- MP9 36- MP12 37- MP13 38- MP14 39- MP15 40- MP22 41- MP23 42- MP24 43- MP25 44- MP28 + Control positivo *N. bombi* - Control negativo.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que ambas dietas de polen fueron adecuadas para que las reinas de *B. pauloensis* y *B. bellicosus* pudieran iniciar la oviposición y criar obreras bajo condiciones de cautiverio. Este hecho permitió evaluar su impacto en el desarrollo de las colonias y corroborar que una dieta con menor diversidad, y menor contenido de proteína cruda y lípidos, no necesariamente afecta el desarrollo de las colonias de ambas especies de forma negativa, o que al menos, su impacto puede no ser percibido bajo los parámetros evaluados, rechazando así la hipótesis de trabajo.

En el presente estudio, la dieta resultó ser una variable significativa únicamente en la especie *B. pauloensis*. Dicha especie, al ser alimentada con polen monofloral, presentó pesos significativamente mayores tanto de las obreras, como de la cabeza seca de las mismas. En la especie *B. bellicosus*, en cambio, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros respecto a las dietas suministradas.

Los resultados obtenidos son inesperados teniendo en cuenta que el polen de eucalipto utilizado (polen monofloral) presentó, además de una menor diversidad de especies botánicas, un bajo contenido de lípidos y un porcentaje de proteína cruda inferior al 20% (valor considerado deficiente para la correcta nutrición de abejas melíferas) (Branchicella *et al.* 2019). Por estos motivos se asume que las colonias bajo esta dieta se encontraron en condiciones nutricionales disminuidas, lo cual no se vió reflejado en el desarrollo de estas especies. La dieta polifloral, por su parte, estaba compuesta por polen proveniente de una gran diversidad de especies vegetales, y presentó un porcentaje de proteína cruda y lípidos mayores que el polen de *E. grandis*. Cabe recalcar que no se analizaron otros componentes del polen, que también se utilizan como indicadores de la calidad nutricional, y que podrían tener un rol importante en la nutrición de ápidos, como los aminoácidos esenciales presentes (Moerman *et al.*, 2015), la composición lipídica específica, o la presencia de compuestos tóxicos, entre otros.

Dado que como se mencionó previamente la mayoría de las colonias de ambas especies y dietas tuvieron que ser sacrificadas en distinto momento con el fin de analizar su microbiota, no se analizaron estadísticamente el número total de obreras emergidas, ni los consumos de néctar y polen. Estos últimos hubiesen sido útiles para intentar explicar los resultados obtenidos, ya que Vaudo *et al.* (2016a;b) encontraron que algunas especies de abejorros (*B. terrestris* y *B. impatiens*) pueden regular la ingesta de dietas para alcanzar relaciones específicas de proteína:lípido, y que a su vez, las preferencias en dicha relación varían para las distintas especies. Por estos motivos, es posible que las colonias de *B. pauloensis* alimentadas con polen monofloral hayan consumido mayores cantidades de polen contrarrestando sus bajos niveles nutricionales. A su vez, la relación entre proteína cruda y lípidos en las dietas suministradas en este estudio fueron diferentes, siendo para el caso de la dieta monofloral 15:1 (proteínas:lípidos), y 8:1 para la dieta polifloral. Esta diferencia podría explicar el impacto diferencial observado entre ambas especies, hipotetizando que ambas tienen distintas preferencias. A su vez, cabe destacar que el peso seco de la cabeza es un parámetro nutricional utilizado en abejas melíferas, pero no es comúnmente utilizado en abejorros, por lo que este parámetro sustenta la diferencia observada en el peso de las obreras, pero no permite realizar afirmaciones concluyentes como buen indicador nutricional.

Independientemente del mecanismo involucrado, las diferencias observadas sugieren que ambas especies tienen requisitos nutricionales diferentes. Mientras que *B. bellicosus* presentó poca variación respecto a los parámetros evaluados, en la especie *B. pauloensis* ocurrió lo opuesto.

A su vez, entre ambas especies alimentadas con dieta monofloral las obreras de *B. pauloensis* presentaron mayor peso fresco que las de *B. bellicosus*, ocurriendo lo opuesto para el peso de la cabeza donde con dieta polifloral, *B. bellicosus* presentó valores mayores que *B. pauloensis*. Diferencias en los rasgos de historia de vida podrían explicar la variación observada tanto en estas especies de

abejorros, como también en otras abejas (Barraud *et al.*, 2022; Moerman *et al.*, 2016; Vaudo *et al.*, 2015)

Particularmente en *A. mellifera*, Invernizzi *et al.* (2011b) hallaron que colmenas que solo disponían de polen de *E. grandis* como recurso alimenticio, presentaron obreras con menor proteína corporal y peor estado sanitario que aquellas que disponían de polen polifloral. A su vez, Branchicella *et al.* (2019), encontraron que colmenas de abejas melíferas emplazadas en plantaciones de *E. grandis* suplementadas regularmente con polen polifloral, presentaron una mayor población de abejas adultas y de cría, que las colonias que solo disponían de dicho polen como recurso alimenticio.

Por otro lado, el número de celdas observadas en los distintos estadios (huevos, larvas y pupas) a los cuarenta días de iniciada la cría, así como el número de bolsillos, no presentaron diferencias significativas entre las diferentes especies alimentadas con las distintas dietas. En cambio, al comparar entre ambas especies alimentadas con la misma dieta, *B. pauloensis* presentó en ambos casos un mayor número de obreras que *B. bellicosus*.

El número de obreras alcanzado en determinado tiempo es un parámetro importante a tener en cuenta en la cría de estas especies y en su posterior utilización como polinizadores de cultivos. Del mismo modo lo es su adaptabilidad a las condiciones de cautiverio. En este sentido, los resultados obtenidos por Moerman *et al.* (2016) al analizar microcolonias de *B. hypnorum*, *B. pratorum* y *B. terrestris* (colonias formadas por pocas obreras, en ausencia de reinas, las cuales producen únicamente machos) bajo tres dietas nutricionales, mostraron que independientemente de la dieta, *B. terrestris* obtuvo un mejor desempeño en los parámetros evaluados, sugiriendo que existen claras diferencias entre las aptitudes propias de cada especie.

Las variaciones inter e intraespecíficas encontradas al comparar el impacto de la nutrición en ambas especies, podrían reflejar las distintas distribuciones que éstas presentan en el continente sudamericano. El mayor número de obreras alcanzado

por *B. pauloensis* en las primeras etapas del ciclo, así como su mayor peso en respuesta a una dieta específica, podría reflejar una mayor adaptabilidad a los recursos disponibles y una mayor explotación de los mismos. En este sentido, cabe destacar que dicha especie presenta una amplia distribución en el continente e incluso es utilizada como polinizadora a nivel comercial, mientras que *B. bellicosus* se encuentra en la lista de especies en riesgo de extinción, donde las causas de esta situación han sido poco estudiadas (Martins *et al.*, 2015).

El presente estudio también permitió comparar los resultados obtenidos con reportes previos de cría, tanto con las mismas especies bajo la misma técnica, así como con otras especies que presentan desafíos similares. En este sentido, tanto los porcentajes de inicio de oviposición obtenidos para ambas especies, así como el de las reinas que lograron la emergencia de al menos una obrera, fueron mayores a los previamente reportados para estas especies en nuestro país por Salvarrey *et al.*, (2013), mostrando un incremento de hasta un 16 y 30%, respectivamente. Específicamente, las proporciones de reinas que iniciaron la oviposición fueron similares a los reportados para otras especies de abejorros por Carnell *et al.*, (2020b) (60-66%), quien también trabajó con dos especies pertenecientes al grupo “hacedores de bolsillo” a partir de reinas colectadas de la naturaleza.

Respecto al tiempo transcurrido entre el inicio de la oviposición y la emergencia de la primera obrera, por más que no se encontraron diferencias significativas entre dietas ni entre especies, se observó un valor estadístico marginal ($p=0,054$). En este sentido, los tiempos medios obtenidos para *B. pauloensis* y *B. bellicosus* (25,7 y 27,8 días, respectivamente) son contrarios y menores a los reportados por Salvarrey *et al.* (2013), quien observó que la duración de este ciclo es de 36,8 días para *B. pauloensis* y 30 días para *B. bellicosus*. Sin embargo, los resultados son similares a los reportados por Cruz *et al.*, (2008) quien observó que la duración promedio del ciclo en *B. pauloensis* es de 24 días. Estas marcadas diferencias en la duración de los ciclos podrían explicarse por factores tales como la calidad

nutricional de las dietas suministradas, así como por una mayor frecuencia de alimentación, ya que el tiempo de desarrollo de las larvas depende en gran medida de estos parámetros (Moerman *et al.*, 2015; Ribeiro, 1994; Sutcliffe & Plowright, 1990).

Respecto a la sanidad de las colonias, *N. ceranae* fue el único microsporidio detectado. El mismo fue encontrado únicamente en una reina del grupo de *B. pauloensis* alimentadas con la dieta monofloral y en dos de sus tres obreras analizadas, resultando en la prevalencia más baja reportada para estas especies en condiciones de cautiverio. No fue detectada la presencia de *N. apis* ni *N. bombi* en ninguna de las muestras. La baja detección de estos patógenos no permitió hacer inferencias respecto al impacto de la alimentación en el estado sanitario de las colonias. Aun así, el hecho de que haya sido encontrada solo una colonia infectada puede estar ligado al buen manejo de medidas sanitarias, entre las que se incluyen la irradiación previa del polen suministrado, la limpieza diaria de los residuos de las colonias, y la desinfección constante del instrumental utilizado. Cabe destacar que únicamente fueron analizadas aquellas colonias que lograron tener al menos tres obreras, y no así las restantes reinas colectadas (incluyendo las que murieron) ni las demás colonias criadas.

Las preocupaciones ambientales, como la crisis de polinizadores, resaltan la necesidad de entender la biología nutricional de estos insectos. Aunque a menudo las estrategias de mitigación se han centrado en aumentar la diversidad de recursos florales, así como en conocer la calidad nutricional de los recursos que estas brindan, estas medidas por sí mismas no resultan suficientes (Vaudo *et al.*, 2015). Para crear planes de conservación que sean representativos de la enorme diversidad de polinizadores resulta necesario profundizar en los requerimientos nutricionales individuales de cada especie. Particularmente en abejorros, como se mencionó previamente, dos especies son principalmente utilizadas como modelo de estudio. Estas, a pesar de ser valiosos modelos, probablemente no reflejen los

requerimientos nutricionales de otras especies (Vaudo *et al.*, 2015; Carnell *et al.*, 2020b).

Los resultados obtenidos en este estudio presentan nuevos aportes en la biología reproductiva de *B. pauloensis* y *B. bellicosus*, y muestran un acercamiento a los efectos que tiene la nutrición en el desarrollo de sus colonias. Además, presentan nuevos resultados alentadores en la cría de estas especies en condiciones de confinamiento y en su utilización como modelo de estudio. A su vez, respaldan que las distintas especies de abejorros pueden tener distintos requerimientos nutricionales y que el origen botánico del polen puede afectar diferencialmente el desarrollo de sus colonias. Por último, subrayan la importancia de utilizar una amplia variedad de especies como modelo para entender el impacto de la nutrición en el desarrollo y sanidad de las colonias del género

6. CONCLUSIONES

1. Una dieta de polen con menor contenido de proteína cruda y lípidos y menor diversidad (por sí misma), no necesariamente afecta de forma negativa el desarrollo de las colonias de *B. pauloensis* y *B. bellicosus*. O al menos, dicho impacto puede no ser percibido en los parámetros analizados.
2. El origen botánico del polen, asociado a su calidad nutricional, afecta de forma diferencial el desarrollo de las colonias de *B. pauloensis* y *B. bellicosus* criadas en condiciones de cautiverio.
3. *B. pauloensis* presenta un mayor número de obreras que *B. bellicosus* en las primeras etapas de su ciclo, lo cual podría estar vinculado con la presencia y distribución de las especies en el continente.
4. Ambas especies presentan potencial para ser utilizadas como modelo de estudio, contribuyendo al conocimiento de los efectos nutricionales en distintos ápidos; y mostrando que es importante profundizar en el impacto de la nutrición en diferentes grupos para crear planes de conservación que sean representativos de la enorme diversidad de polinizadores existente.

7. PERSPECTIVAS

A futuro se plantea analizar bajo el mismo protocolo de cría otros aspectos que no fueron evaluados, como la producción de sexados. Este es un aspecto importante, tanto por las implicancias que tiene la dieta en las distintas castas de abejorros, así como por la técnica de cría, en la que aún no se ha estudiado. De la misma forma estudiar la dinámica de crecimiento de los estadios inmaduros de las colonias, los cuales podrían ser marcados individualmente permitiendo comparaciones en el tiempo.

A su vez se pretende evaluar en condiciones de campo el desarrollo y la sanidad de las colonias, de acuerdo a la disponibilidad de recursos naturales.

Por último, dado que esta tesis fue enmarcada en un proyecto mayor que busca analizar y comparar la microbiota intestinal asociada entre las distintas dietas, sería interesante poseer los resultados y contrastarlos con los resultados obtenidos en este estudio.

7. INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Medias y desvíos

	Promedio $\pm$ desvío estándar			
	<i>Bombus pauloensis</i> monofloral (MP)	<i>Bombus pauloensis</i> polifloral (PP)	<i>Bombus bellicosus</i> monofloral (MB)	<i>Bombus bellicosus</i> polifloral (PB)
Celdas de huevos (*)	1,1 $\pm$ 1,17	1,3 $\pm$ 1,13	0,89 $\pm$ 0,76	1,36 $\pm$ 1,0
Celdas de larvas (*)	2,95 $\pm$ 3,70	3,35 $\pm$ 2,33	3,50 $\pm$ 3,49	1,70 $\pm$ 2,42
Celdas de pupas (*)	2,15 $\pm$ 2,68	1,55 $\pm$ 1,88	1,67 $\pm$ 2,28	1,24 $\pm$ 2,20
Obreras (*)	2,15 $\pm$ 2,20	0,90 $\pm$ 1,29	0,72 $\pm$ 1,32	0,06 $\pm$ 0,24
Bolsillos (*)	1,50 $\pm$ 1,57	1,35 $\pm$ 1,09	1,06 $\pm$ 1,21	0,53 $\pm$ 0,94
Tiempo de desarrollo (Días)	24,29 $\pm$ 2,33	27,14 $\pm$ 3,23	27,38 $\pm$ 4,79	28,23 $\pm$ 3,81

Peso fresco de las obreras nacidas (g)	0,15 ± 0,05	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,10
Peso seco de la cabeza de las obreras (g)	0,0062 ± 0,0016	0,0047 ± 0,0010	0,0057 ± 0,015	0,0054 ± 0,0012

(*) Como unidad de medida se utiliza el número observado a los 40 días de iniciada la cría por un único operador

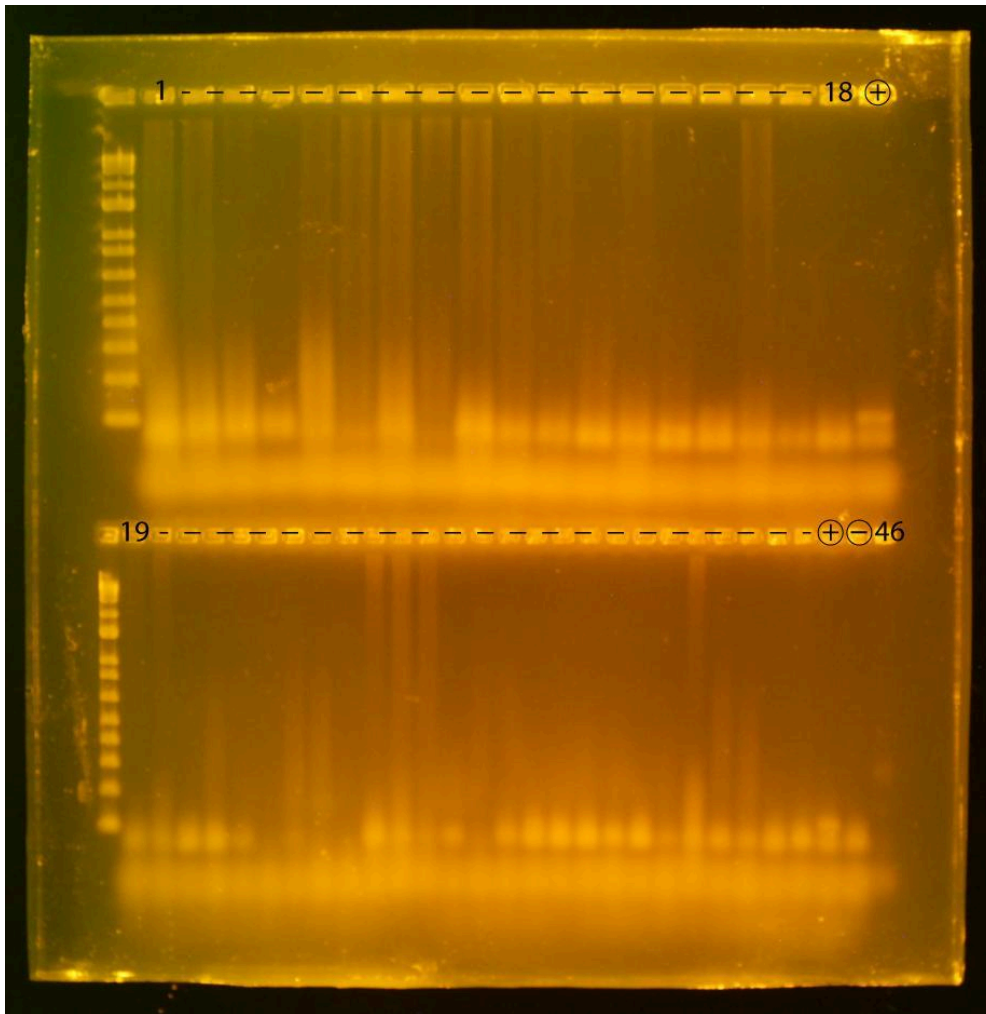


Figura 19: Amplificación de fragmentos del gen ARNr18S de *N. bombi* utilizando cebadores específicos para este microsporidio. El fragmento amplificado para *N. bombi* se estimó en 101 pb.

Carriles: 1- Reina MP12 2- Reina MP13 3- Reina MP14 4- Reina MP15 5- Reina MP23 6- Reina MP16 7- Reina MP28 8- Reina MP3 9- Reina MP4 10- Reina MP9 11- Reina MB1 12- Reina MB10 13- Reina MB12 14- Reina MB13 15- Reina MB17 16- Reina MB 17- Reina MB3 18- Reina MB4 19- Reina MB6 20- Reina MB8 21- Reina PP1 22- Reina PP11 23- Reina PP15 24- Reina PP16 25- Reina PP2 26- Reina PP21 27- Reina PP28 28- Reina PP30 29- Reina PP7 30 Reina PP9 31 Reina PB12 32- Reina PB13 33- Reina PB19 34- Reina PB20 35- Reina PB26 36- Reina PB4 37- Reina PB5 38- Reina PB6 39- Reina PB7 40- Reina PB8 41- Reina

MB14 42- Reina PP27 43- Reina PB21 44- Pool de obreras MB20 45- Pool de obreras MB20 (no se pudo correr en el correspondiente gel por falta de espacio)

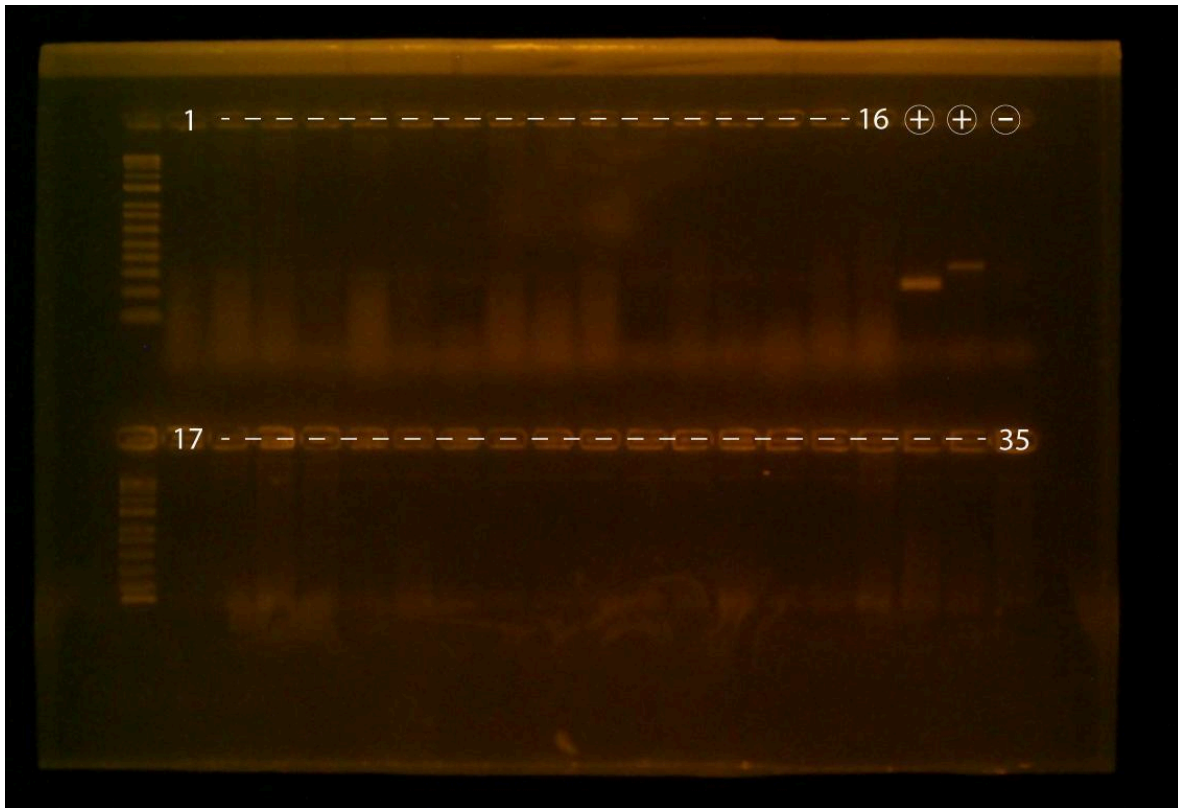


Figura 20. Amplificación de fragmentos del gen ARNr 18S de *N. ceranae* y *N. apis*. Utilizando cebadores específicos para estos microsporidios. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 280 pb y el de *N. apis* en 321 pb.

Carriles: 1- Reina MP14 2- Reina MP23 3-Reina MP25 4-Reina MB10 5- Reina MB12 6- Reina MB13 7- Reina MB17 8-Reina MB20 9-Reina MB3 10- Reina MB4 11- reina MB6 12- Reina MB8 13- Reina PP1 14-Reina PP11 15- Reina PP15 16-Reina PP16 17- Reina PP2 18- Reina PP21 19- Reina PP28 20- Reina PP30 21-Reina PP7 22-Reina PP9 23 Reina PB12 24- Reina PB13 25- Reina PB19 26- Reina PB20 27-Reina PB26 28-Reina PB4 29-Reina PB5 30- Reina PB6 31- Reina PB7 32- Reina PB8 33- Reina MB14 34- Reina PA27 35- PB21

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, S., Khan, S. A., Khan, K. A., & Li, J. (2021). Novel Insight Into the Development and Function of Hypopharyngeal Glands in Honey Bees. *Frontiers in physiology*, 11, 615830. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.615830>
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M. (2009). How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*, 103(9), 1579–1588. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp076>
- Alarcón, M. (2023). Evaluación de suplementos nutricionales para mejorar la salud y productividad de colmenas de abejas melíferas, en forestaciones de *Eucalyptus grandis* (Tesis de licenciatura). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J. L., & Conte, Y. Le. (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(3), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.12.005>
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., van Engelsdorp, D., y Zunino, P. (2016). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013-2014. *Apidologie*, 48, 364-370. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0482-2>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x>
- Arbulo, N. (2015). *Nosema ceranae* en los abejorros nativos *Bombus atratus* y *B. bellicosus* (Tesis de maestría, Universidad de la República, Facultad de Ciencias - PEDECIBA). <https://hdl.handle.net/20.500.12008/23251>
- Arbulo, N., Antúnez, K., Salvarrey, S., Santos, E., Branchicella, B., Martín-Hernández, R., Higes, M., & Invernizzi, C. (2015). High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 165–168. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.018>
- Arien, Y., Dag, A., Zarchin, S., Masci, T., & Shafir, S. (2015). Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(51), 15761–15766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517375112>
- Babin, A., Schurr, F., Riviére, M. P., Chauzat, M. P., & Dubois, E. (2022). Specific detection and quantification of three microsporidia infecting bees, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, and *Nosema bombi*, using probe-based real-time PCR. *European Journal of Protistology*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2022.125935>
- Baloglu, G. H., & Gurel, F. (2015). The effects of pollen protein content on colony development of the bumblebee, *bombus terrestris* L. *Journal of Apicultural Science*, 59(1), 83–88. <https://doi.org/10.1515/JAS-2015-0009>
- Barraud, A., Barascou, L., Lefebvre, V., Sene, D., Le Conte, Y., Alaux, C., Grillenzoni, F.-V., Corvucci, F., Serra, G., Costa, C., Vanderplanck, M., & Michez, D. (2022).

- Variations in nutritional requirements across bee species. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.824750>
- Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C., Martínez de la Escalera, G., Mendoza, Y., Santos, E., Silva, C., Zunino, P., & Antúnez, K. (2019). Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46453-9>
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.47.2.12>
- Cardoza, Y. J., Harris, G. K., & Grozinger, C. M. (2012). Effects of soil quality enhancement on pollinator-plant interactions. *Psyche (London)*, Article 581458. <https://doi.org/10.1155/2012/581458>
- Carnell, J., Hüge, R., Goulson, D., & Huges, W. (2020b). Effect of diet on incipient colony success for two long-tongued bumblebee species in the laboratory. *Insectes Sociaux*, 67(4), 531–539. <https://doi.org/10.1007/s00040-020-00792-3>
- Carnell, J., Hüge, R., & Huges, W. (2020a). A review of nutrition in bumblebees: The effect of caste, life-stage and life history traits. *Advances in Insect Physiology*, 59, 71–129. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2020.09.003>
- Carnell, J., Page, S., Goulson, D., & Huges, W. (2020c). Trialling techniques for rearing long-tongued bumblebees under laboratory conditions. *Apidologie*, 51(2), 254–266. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00707-7>
- Castelli, L., Branchiccela, B., Garrido, M., Invernizzi, C., Porrini, M., Romero, H., Santos, E., Zunino, P., & Antúnez, K. (2020). Impact of nutritional stress on honeybee gut microbiota, immunity, and *Nosema ceranae* infection. *Microbial Ecology*, 80(4), 908–919. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01538-1>
- Castelli, L., Branchiccela, B., Romero, H., Zunino, P., & Antúnez, K. (2022). Seasonal Dynamics of the Honey Bee Gut Microbiota in Colonies Under Subtropical Climate. *Microbial Ecology*, 83(2), 492–500. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01756-1>
- 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(8), 1090–1095. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.016>
- Cruz, P., Escobar, A., Almanza, M. T., & Cure, J. R. (2008). Implementación de mejoras para la cría en cautiverio de colonias del abejorro nativo *Bombus pauloensis* (= *B. atratus*) (Hymenoptera: Apoidea). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 4(1), 70–83. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2233>
- Delph, L. F., Johannsson, M. H., & Stephenson, A. G. (1997). How Environmental Factors Affect Pollen Performance: Ecological and Evolutionary Perspectives. *Ecology*, 78(6), 1632–1639. <https://doi.org/10.2307/2266087>
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J. L., Plettner, E., Belzunces, L. P., & Le Conte, Y. (2010). *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, 36(5), 522–525. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9786-2>
- 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. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.07>

- FAO. (2020). The pollination services of forests: A review of forest and landscape interventions to enhance their cross-sectoral benefits. *FAO and Bioversity International*. <https://doi.org/10.4060/ca9433en>
- Franzen, C. (2008). Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal (Vol. 2)*. <http://gallica.bnf.fr>.
- Fries, I. (1993). *Nosema Apis*—A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World*, 74(1), 5–19. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1993.11099149>
- Goulson. (2010). *Bumblebees: Behaviour, Ecology, and Conservation*. Oxford University Press
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347 (6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0018-2016>.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M. J., Mayo, R., & Bernal, J. L. (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014>.
- Grassnigg, N., & Crailsheim, K. (1998). Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology*, 44(10), 929–939. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00058-4)
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Arreondo, D., Branchiccela, B., Castelli, L., & Juri, P. (2022). Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay Novedades de la última década. *Veterinaria (Montevideo)*, 217. <https://doi.org/10.29155/vet.58.217.4>.
- Invernizzi, C., Santos, E., García, E., Daners, G., Di Landro, R., Saadoun, A., & Cabrera, C. (2011). Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations. *Archivos de Zootecnia*, 60(232), 1303–1314. <https://doi.org/10.4321/s0004-05922011000400045>.
- Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual review of microbiology*, 56, 93–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(84\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(84)90026-0)

- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-07>.
- Mayack, C., & Naug, D. (2010). Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology*, 56(11), 1572–1575. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.05.016>
- Mendoza, Y., Harriet, J., Campa, J., Katz, H., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S., & Invernizzi, C. (2013). Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia*, 17(1), 108–113. <https://doi.org/10.31285/agro.17.522>.
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World* (Vol. 2).
- Moerman, R., Roger, N., De Jonghe, R., Michez, D., & Vanderplanck, M. (2016). Interspecific variation in bumblebee performance on pollen diet: New insights for mitigation strategies. *PLoS ONE*, 11(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168462>.
- Moerman, R., Vanderplanck, M., Fournier, D., Jacquemart, A. L., & Michez, D. (2017). Pollen nutrients better explain bumblebee colony development than pollen diversity. *Insect Conservation and Diversity*, 10(2), 171–179. <https://doi.org/10.1111/icad.12213>.
- Moerman, R., Vanderplanck, M., Roger, N., Declèves, S., Wathélet, B., Rasmont, P., Fournier, D., & Michez, D. (2015). Growth rate of bumblebee larvae is related to pollen amino acids. *Journal of Economic Entomology*, 109(1), 25–30. <https://doi.org/10.1093/jee/tov279>.
- Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46(2), 197–204. <https://doi.org/10.1080/15627020.2011.11407495>
- Nicolson, S. W., & Thornburg, R. W. (2007). Nectar chemistry. In S. W. Nicolson & R. W. Thornburg (Eds.), *Nectaries and Nectar* (pp. 215–264). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5937-7_5
- Otti, O., & Schmid-Hempel, P. (2008). A field experiment on the effect of *Nosema bombi* in colonies of the bumblebee *Bombus terrestris*. *Ecological Entomology*, 33(5), 577–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.00998.x>
- Pacateque, J., Cruz, P., Aguilar, M. L., & Cure, J. R. (2012). Efecto de alimentación vía bolsillo en etapas tempranas del desarrollo de *Bombus atratus* (hymenoptera: Apidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 38(2), 343–346. <https://doi.org/10.25100/socolen.v38i2.9016>
- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A. H., Lange, C., & Higes, M. (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 131–135. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00018.x>
- Plischuk, S., Salvarrey, S., Arbulo, N., Santos, E., Skevington, J. H., Kelso, S., Revainera, P. D., Maggi, M. D., Invernizzi, C., & Lange, C. E. (2017). Pathogens, parasites, and parasitoids associated with bumble bees (*Bombus spp.*) from Uruguay. *Apidologie*, 48(3), 298–310. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0474-2>

- Ptáček, V. (2001). Some biological aspects of bumble bee (*Bombus*, Hymenoptera) management. *Acta Horticulturae*, (561), 279-286.
<https://doi.org/10.17660/actahortic.2001.561.42>
- Ptáček, V., Votavová, A., & Komzáková, O. (2015). Experience in rearing common carder bees (*Bombus Pascuorum Scop.*), with some notes on three similar species: Shrill carder bee (*B. Sylvarum L.*), red-shanked carder bee (*B. Ruderarius Müll.*), and brown-banded carder bee (*B. Humilis Ill.*) (Hymenoptera: Apidae). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 63(5), 1535–1542. <https://doi.org/10.11118/actaun201563051535>
- Ramos, Y., Salvarrey, S., Zaccari, F., Barboza, L., Arrillaga, F., & Pascual, O. (2023). Sustainable Beekeeping, from the south of the world. In J. Pettis (Ed.), *Characteristics of squash (Cucurbita maxima) fruits pollinated with honey bees and bumblebees (Bombus pauloensis)* (pp. 211–211). Apimondia.
www.apimondia2023.com
- Requier, F., Leyton, M. S., Morales, C. L., Garibaldi, L. A., Giacobino, A., Porrini, M. P., Rosso-Londoño, J. M., Velarde, R. A., Aignasse, A., Aldea-Sánchez, P., Allasino, M. L., Arredondo, D., Audisio, C., Cagnolo, N. B., Basualdo, M., Branchiccela, B., Calderón, R. A., Castelli, L., Castilhos, D., ... Antúñez, K. (2024). First large-scale study reveals important losses of managed honey bee and stingless bee colonies in Latin America. *Scientific Reports*, 14(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-59513-6>
- Riaño, D., Veloza, M., Cure, J. R., & Almanza, M. T. (2014). Desarrollo de Dos Colonias de *Bombus Atratus* (Hymenoptera: Apidae) Mantenidas Bajo Dos Modos de Alimentación. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 10(2), 132.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.325>
- Ribeiro, M. F. (1994). Growth in bumble bee larvae: relation between development time, mass, and amount of pollen ingested. *Canadian Journal of Zoology*. 72(11), 1978-1985. <https://doi.org/10.1139/z94-270>
- Rotheray, E. L., Osborne, J. L., & Goulson, D. (2017). Cuantificación de los requerimientos alimenticios y los efectos del estrés alimenticio en el desarrollo del nido en abejorros. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 288–299.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1307712>
- Roulston, T. H., & Cane, J. H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222(1–4), 187–209.
<https://doi.org/10.1007/BF00984102>
- Roulston, T. H., Cane, J. H., & Buchmann, S. L. (2000). What Governs Protein Content of Pollen: Pollinator Preferences, Pollen-Pistil Interactions, or Phylogeny? *Ecological Monographs*, 70(4), 617. <https://doi.org/10.2307/2657188>
- Ryder, J. T., Cherrill, A., Thompson, H. M., & Walters, K. F. A. (2021). Lower pollen nutritional quality delays nest building and egg laying in *Bombus terrestris audax* micro-colonies leading to reduced biomass gain. *Apidologie*, 52(6), 1033–1047.
<https://doi.org/10.1007/s13592-021-00885-3>
- Salvarrey, S. (2019a). Ficha zoológica *Bombus atratus* (Franklin 1912) (Hymenoptera: Apidae). *Boletín de La Sociedad Zoológica Del Uruguay*, 27(2), 34–36.
www.szu.org.uy/

- Salvarrey, S. (2019b). Ficha zoológica: *Bombus bellicosus* (Smith, 1879) Hymenoptera; Apoidea,. *Boletín de La Sociedad Zoológica Del Uruguay*, 28(2), 24–26.
www.szu.org.uy/
- Salvarrey, S., Antúnez, K., Arredondo, D., Plischuk, S., Revainera, P., Maggi, M., & Invernizzi, C. (2021). Parasites and RNA viruses in wild and laboratory reared bumble bees *Bombus pauloensis* (Hymenoptera: Apidae) from Uruguay. *PLoS ONE*, 16(4 April). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249842>
- Salvarrey, S., Arbulo, N., & Santos, E. (2013). Cría artificial de abejorros nativos *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* (Hymenoptera, Apidae). *Agrociencia Uruguay*, 24(1), <https://doi.org/10.31285/AGRO.17.478>
- Salvarrey, S., Arbulo, N., Rossi, C., Santos, E., Salvarrey, L., & Invernizzi, C. (2017). Utilización de abejorros nativos (*Bombus atratus* Franklin y *Bombus bellicosus* Smith) para mejorar la producción de semillas del trébol rojo (*Trifolium pratense*). *Agrociencia Uruguay*, 21(1), 95-104. Recuperado de:
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7063/1/Agrociencia-21-1p.95-104.pdf>
- Salvarrey, S., Santos, E., Arbulo, N., Giménez, G., & Invernizzi, C. (2020). Characteristics of the tomato fruit (*Solanum lycopersicum*) using native bumblebees (*Bombus atratus*) as pollinators in greenhouse. *Agrociencia*, 24(1). <https://doi.org/10.31285/agro.24.101>
- Santos, E., Arbulo, N., Salvarrey, S., & Invernizzi, C. (2017). Distribución de las especies del género *Bombus* Latreille (Hymenoptera, Apidae) en Uruguay. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 76(1–2), 22–27.
<https://doi.org/10.25085/rsea.761203>
- Santos, E., Invernizzi, C., García, E., Cabrera, C., Di Landro, Saadoun, A., & Daners, G. (2009). Contenido de proteína cruda del polen de las principales especies botánicas utilizadas por las abejas melíferas en Uruguay. *Agrociencia*, 13(2), 9–13.
- Schmid-Hempel P. (2001). On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Die Naturwissenschaften*, 88(4), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s001140100222>
- Schmidt, L. S., Rao, R., & Wang, W. (1995). Feeding Preference and Survival of Young Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Fed Rape, Sesame, and Sunflower Pollen. *J. Econ. Entomol.*, 88(6), 1591-1595.
<https://academic.oup.com/jee/article-abstract/88/6/1591/2216342>
- Sladen, F. (1912). The Humble-Bee, Its Life-History and How to Domesticate It. *Macmillan & Co, London*.
- Somerville DC (2001) Nutritional value of bee collected pollens. *Rural Industries Research and Development Corporation* 1–166
- Sutcliffe, G., & Plowright, R. (2011). The effects of pollen availability on development time in the bumble bee *Bombus terricola* K. (Hymenoptera: Apidae). *Canadian Journal of Zoology*, 68(6), 1120–1123. <https://doi.org/10.1139/z90-166>
- Tasei, J. N., & Aupinel, P. (2008a). Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 39(4), 397–409.
<https://doi.org/10.1051/apido:2008017>
- Tasei, J. N., & Aupinel, P. (2008b). Validation of a method using queenless *Bombus terrestris* micro-colonies for testing the nutritive value of commercial pollen mixes

- by comparison with queenright colonies. *Journal of Economic Entomology*, 101(6), 1737–1742. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-101.6.1737>
- Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathelet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees?. *PloS one*, 9(1), e86209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086209>
- Vaudo, A. D., Patch, H. M., Mortensen, D. A., Tooker, J. F., & Grozinger, C. M. (2016a). Macronutrient ratios in pollen shape bumble bee (*Bombus impatiens*) foraging strategies and floral preferences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(28), 4035–4042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606101113>
- Vaudo, A. D., Stabler, D., Patch, H. M., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Wright, G. A. (2016b). Bumble bees regulate their intake of essential protein and lipid pollen macronutrients. *Journal of Experimental Biology*, 219(24), 3962–3970. <https://doi.org/10.1242/jeb.140772>
- Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current opinion in insect science*, 10, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.008>
- Velthuis, H. H. W. (2002). The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture. In P. Kevan & V. L. Imperatriz-Fonseca (Eds.), *Pollinating bees: The conservation link between agriculture and nature* (pp. 177– 184). Ministry of Environment.
- Velthuis, H. H. W., & Van Doorn, A. (2006). A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, (37)4 421-451. <https://doi.org/10.1051/apido:2006019>
- Verbeke, S., Boeraeve, M., Carpentier, S., Jacquemyn, H., & Pozo, M. I. (2023). The impact of plant diversity and vegetation composition on bumblebee colony fitness. In *Oikos* (Vol. 2023, Number 6). Nordic Ecological Society. <https://doi.org/10.1111/oik.09790>
- Watrobska, C. M., Ramos Rodrigues, A., Arce, A. N., Clarke, J., & Gill, R. J. (2020). Pollen Source Richness May Be a Poor Predictor of Bumblebee (*Bombus terrestris*) Colony Growth. *Frontiers in insect science*, 1, 741349. <https://doi.org/10.3389/finsc.2021.741349>
- Willmer, P. (2011). *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press. <http://www.jstor.org/stable/j.ctt7rn7p>
- Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 316–322. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.316-322.1996>