

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

**EVALUACIÓN DE SUPLEMENTOS NUTRICIONALES PARA MEJORAR
LA SALUD Y PRODUCTIVIDAD DE COLMENAS DE ABEJAS MELÍFERAS,
EN FORESTACIONES DE *EUCALYPTUS GRANDIS***



Bach. Matilde Alarcón

Orientadora: Dra. Karina Antúnez

Co-orientadora: Dra. Loreley Castelli

Laboratorio de Microbiología y Salud de las Abejas, Departamento de Microbiología,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

2023

1. AGRADECIMIENTOS

Agradecerle a Pablo Zunino por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme realizar allí mi pasantía.

A Karina por recibirme con gran disposición desde la primera reunión en donde era todo dudas e incertidumbre. Aceptar ser mi tutora, enseñándome, aconsejándome y guiándome en todo momento.

A Lore también por enseñarme y acompañarme en todo el proceso, respondiendo mis dudas y resolviendo problemas.

Al team abejas y a la colonia por su ayuda en el laboratorio, la compañía en los almuerzos, las risas compartidas.

A todos los de INIA, a Belén y a Ciro que fueron parte fundamental de mi acercamiento a las abejas e hicieron mucho más amenas las calurosas jornadas de los muestreos, compartiendo almuerzos y experiencias.

Fundamentalmente a mis padres y mi hermana que me han apoyado y confiado en mí desde que tengo memoria y me han impulsado a ser una mejor persona. Al resto de mi familia por siempre acompañarme.

A mis amigos y a Brandon por la compañía de siempre, el apoyo, la confianza, la paciencia y la comprensión.

Muchas gracias!

Matilde

2. RESUMEN

Durante los últimos años se han reportado grandes pérdidas de colmenas de abejas *Apis mellifera* alrededor del mundo, siendo varias las causas posiblemente involucradas. Dentro de las mismas se encuentra el aumento en el área de monocultivos que conlleva una disminución en la diversidad de polen disponible para las abejas, generando problemas nutricionales, la infección por diferentes patógenos y la intoxicación por agroquímicos. Esta situación ha generado gran preocupación por la importancia que tienen las abejas melíferas como polinizadores de cultivos agrícolas y plantas silvestres, y secundariamente, por la producción de miel, polen y cera, entre otros productos derivados de la colmena y utilizados por el hombre desde hace miles de años. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el uso de distintos suplementos nutricionales como estrategia para mejorar la fortaleza, nutrición y productividad de abejas melíferas en colmenas emplazadas en una forestación de *Eucalyptus grandis*, situación en la que se genera estrés nutricional. Para alcanzar el objetivo, en febrero se seleccionó un apiario comercial de 100 colmenas, localizado en Colonia. Las colmenas se dividieron en 5 grupos de 20 y se les administró diferentes tratamientos: suplementación con una torta de polen polifloral, suplementación con el producto proteico comercial Apiprot, suplementación con el producto proteico comercial Feedbee, suplementación con una torta de preparación casera diseñada en Apicultura, INIA, y finalmente, un grupo no recibió tratamiento (control). A fines de febrero las colmenas se trasladaron a una forestación de *E. grandis*, en Rivera, donde se mantuvieron hasta mayo, final de la floración, para luego volver a Colonia. Al inicio del ensayo (febrero), en la floración (fines de marzo y principios de mayo) y previo a la llegada de la primavera, se evaluó la fortaleza de la colmena mediante la estimación de la población adulta y cría y se cuantificó la producción de miel. A la vez se realizaron muestreos para evaluar el nivel de infección con *Varroa destructor*, *Nosema* spp. y estimar el peso seco de cabeza y tórax, como marcador del estado nutricional. Los resultados obtenidos muestran una mejora en la fortaleza en aquellas colmenas que fueron suplementadas en relación al grupo control, ya sea a corto plazo (durante la floración) o a largo plazo (al finalizar el invierno). Además, empleando Apiprot y la torta de preparación casera se observó una mayor producción de miel. En relación al peso seco del tórax y de la cabeza, las abejas analizadas de las colmenas suplementadas presentaron valores mayores de al menos algún parámetro durante la floración en relación al grupo control. En cambio, al finalizar el invierno el peso seco disminuyó en estas colmenas, posiblemente debido al desgaste ocasionado por una mayor producción. Por último, en cuanto a la infección con el microsporidio *Nosema* spp., se observó un aumento en el número de esporas por abeja al final de la floración, coincidiendo con estudios previos, pero no se observó un efecto de los suplementos nutricionales. Estos hallazgos muestran que, en las condiciones estudiadas, la suplementación nutricional de las colmenas ya sea con productos caseros o comerciales, ayuda a mejorar la fortaleza y productividad de las abejas melíferas.

Tabla de contenido

1. AGRADECIMIENTOS.....	2
2. RESUMEN	3
Tabla de contenido.....	4
4. INTRODUCCIÓN	6
4.1 Importancia de <i>Apis mellifera</i>	6
4.2 Pérdida de colmenas	7
4.3 Patógenos de las abejas <i>Apis mellifera</i>	7
4.3.1 <i>Varroa destructor</i>	7
4.3.2 Microsporidio <i>Nosema</i> spp.	9
4.4 Nutrición	11
4.4.1 Estrés nutricional	11
4.5 <i>Apis mellifera</i> en Uruguay	12
4.5.1 Trashumancia	14
4.6 Antecedentes.....	15
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
5.1 Hipótesis	16
5.2 Objetivo general	16
5.3 Objetivos específicos	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Diseño experimental.....	17
6.2 Preparación de las tortas.....	19
6.3 Evaluación de la fortaleza de la colmena	19
6.4 Estimación de la producción de miel.....	19
6.5 Determinación del nivel de infección por <i>V. destructor</i>	20
6.6 Determinación del nivel de infección por <i>Nosema</i> spp.....	20
6.7 Determinación de la especie de <i>Nosema</i>	21
6.7.1 Obtención de muestras de abejas	21
6.7.2 Extracción de ADN	21
6.7.3 Amplificación del ADN mediante PCR múltiplex.....	22
6.7.4 Electroforesis en gel de agarosa	23
6.8 Estimación del peso seco de las abejas	23
6.9 Obtención y almacenamiento de muestras	23

6.10 Estimación del consumo	24
6.11 Análisis de los resultados.....	24
7. RESULTADOS.....	26
7.1 Evaluación de la fortaleza de la colmena	26
7.2 Producción de miel	30
7.3 Infección por <i>Varroa destructor</i>	31
7.4 Infección por <i>Nosema</i> spp.	32
7.5 Determinación de la especie de <i>Nosema</i>	33
7.6 Estado nutricional.....	34
7.7 Consumo de las tortas	37
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	42
10. PERSPECTIVAS	43
11. ANEXO	44
11.1 Tabla con datos de promedio y desvío estándar de cada ensayo por tratamiento y muestreo.....	44
11.2 Estimación del consumo de cada tratamiento	45
11.3 Información nutricional de los suplementos utilizados	45
12. REFERENCIAS	47

4. INTRODUCCIÓN

4.1 Importancia de *Apis mellifera*

Los insectos polinizadores, dentro de los cuales se ubican las abejas nativas como las introducidas, polinizan aproximadamente el 90% de las plantas con flor (Ollerton *et al.*, 2011) y son primordiales para el 35% de los cultivos a nivel mundial (Klein *et al.*, 2007). La polinización es la transferencia de polen desde los estambres (órgano masculino) hasta el estigma (órgano femenino) de la flor, efectuándose así la fecundación y la consecuente producción de frutos y semillas. Este proceso puede ser llevado a cabo tanto por vectores bióticos (animales) como abióticos (agua o viento) pero la gran mayoría de las plantas con flor dependen de los primeros, principalmente de los insectos (FAO, 2014; Mauseth, 2019; Ollerton *et al.*, 2021).

La abeja *Apis mellifera* es una de las especies polinizadoras más importantes debido a su amplia distribución, comportamiento de alimentación generalista, competencia y frecuencia con la que visitan las flores (Nates Parra, 2005; Hung *et al.*, 2018). Esto no solo les permite a los productores agrícolas mejorar sus rendimientos en la producción, sino también es un aporte a la biodiversidad tanto de áreas urbanas como silvestres (Southwick *et al.*, 1992), siendo entonces difícil estimar su valor real para nosotros como sociedad.

Además de lo mencionado anteriormente, las abejas melíferas tienen un gran valor económico y medicinal por las características de los productos derivados de la colmena: miel, propóleos, cera, entre otros (Hepburn, 1986; Crane, 1990; Nader *et al.*, 2021).

La miel ha sido utilizada por la humanidad desde la antigüedad, por ser un producto con importantes propiedades tanto nutricionales como terapéuticas (Saralaya *et al.*, 2021). En relación a la nutrición, fue uno de los primeros alimentos del hombre y es, incluso en la actualidad, muy utilizado por ser un alimento dulce, natural y no refinado (American Honey Institute, 1943).

El propóleos es una resina derivada de secreciones de plantas y árboles, con gran importancia medicinal por sus propiedades antibacterianas, demostrada en una variedad de especies, antifúngicas y/o antivirales, entre otras (Marcucci, 1994; Simone y Spivak, 2010).

Por último, la cera de abejas es una secreción natural de las glándulas ceríparas, conocidas como glándulas de cera, usada por *A. mellifera* como material para construir la colmena (Vit,

2005). A lo largo de la humanidad, le hemos dado a este producto tanto usos clínicos como cosméticos y alimenticios (Saralaya *et al.*, 2021).

4.2 Pérdida de colmenas

En los últimos años se han reportado claras evidencias de pérdida de polinizadores, tanto silvestres como domésticos, generando gran preocupación a nivel mundial. Entre los polinizadores afectados se encuentran las abejas *A. mellifera* (Potts *et al.*, 2010; Steinhauer *et al.*, 2014).

En América Latina, a diferencia de América del Norte y Europa, no hay tanta información acerca de esta situación. En 2018 se realizó una síntesis de los datos recopilados en diferentes países de la región, registrándose altas tasas de pérdidas de colmenas, y revelando un panorama preocupante para la apicultura (Requier *et al.*, 2018). Particularmente en nuestro país, se reportaron pérdidas anuales promedio de aproximadamente el 30% en 2012 – 2016 (Antúñez *et al.*, 2017; Requier *et al.*, 2018).

Las causas de estas pérdidas son múltiples y difíciles de considerar de forma aislada. Entre ellas se encuentran la infección por múltiples plagas y patógenos, la intoxicación por pesticidas y el estrés nutricional. Este último está asociado al cambio en el uso de la tierra y al aumento de monocultivos, lo que conlleva a la disminución de la diversidad de polen disponible para las abejas (Potts *et al.*, 2010; Steinhauer *et al.*, 2014).

4.3 Patógenos de las abejas *Apis mellifera*

4.3.1 *Varroa destructor*

Una de las mayores amenazas para la salud de las abejas es el ácaro *Varroa destructor* (Olate-Olave *et al.*, 2021), previamente conocido como *Varroa jacobsoni* (Anderson y Trueman, 2000). Su hospedero original era la abeja asiática *Apis cerana* y en algún momento a principios de este siglo amplió su rango a *A. mellifera*, teniendo gran éxito y esparciéndose alrededor de todo el mundo (Oldroyd, 1999; Anderson y Trueman, 2000).

Este ectoparásito se alimenta de los cuerpos grasos de las abejas adultas y en desarrollo (Ramsey *et al.*, 2019). El cuerpo graso es un órgano muy importante en los insectos ya que se encarga del almacenamiento y utilización de la energía (Arrese y Soulages, 2010), además de secretar una enorme cantidad de proteínas de gran relevancia (Kerkut y Gilbert, 1985).

Su ciclo de vida consta de dos fases esencialmente distintas: una fase forética en abejas adultas y una fase reproductiva dentro de las celdas de cría, tanto de obreras como de zánganos (Rosenkranz *et al.*, 2010) (Figura 1).

En la fase forética, la abeja adulta es utilizada como vector de transporte y fuente de alimento tanto dentro de la colonia como entre éstas (Nazzi y Le Conte, 2016).

La fase reproductiva comienza cuando *V. destructor* invade una celda de cría que contiene una larva de abeja o de zángano, justo antes de ser operculada (Salamanca Grosso *et al.*, 2012; Nazzi y Le Conte, 2016; Noël *et al.*, 2020).

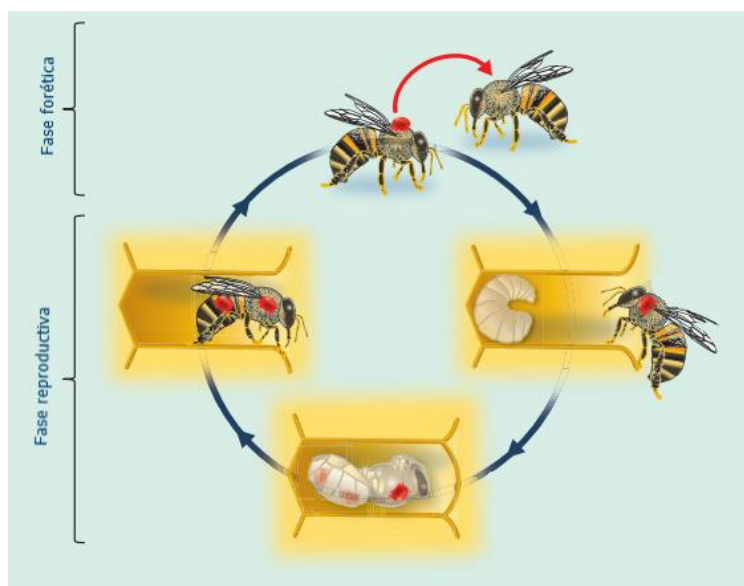


Figura 1. Ciclo de vida de *V. destructor*, el cual consta de una fase forética en abejas adultas, y una fase reproductiva dentro de celdas de cría. Fuente: Nazzi y Le Conte, 2016.

V. destructor afecta a los miembros de la colonia de múltiples formas (Noël *et al.*, 2020). Por un lado, se han visto consecuencias en la fisiología de las abejas, ya que aquellas que fueron infestadas en su estadio de huevo, larva y/o pupa, emergen con un peso corporal y un contenido de agua menor al de abejas sanas (De Jong *et al.*, 1982; Bowen-Walker y Gunn, 2001). Por otro lado, el comportamiento de vuelo también se ve perjudicado. En abejas pecoreadoras parasitadas, la capacidad de orientación disminuye respecto a las no infectadas (Kralj y Fuchs, 2006), y en los zánganos disminuye la duración del vuelo, vinculándose con una menor producción de esperma y por tanto se ve afectada su aptitud reproductiva (Duay *et al.*, 2002).

Además del daño directo, también actúa como vector horizontal de virus de forma muy eficiente, principalmente el Virus de las Alas Deformes (DWV) (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Evans y Schwarz, 2011).

Por los motivos explicados previamente, y para evitar la pérdida de las colmenas, los apicultores deben controlar la infestación por este ácaro, utilizando tanto productos químicos como orgánicos (Haber *et al.*, 2019).

4.3.2 Microsporidio *Nosema* spp.

Los microsporidios son un grupo considerablemente grande de parásitos intracelulares obligatorios conocidos desde hace más de 150 años (Fries, 1993; Fadhilah *et al.*, 2022). Tienen una distribución ubicua en el medio ambiente y pueden infectar a casi todos los vertebrados e invertebrados, incluidas las abejas (Weiss y Becnel, 2014).

Como su propio nombre indica, son organismos formadores de esporas, las cuales no solo le permiten propagarse entre sus hospederos, sino que también le confieren gran resistencia a las condiciones climáticas cuando están en vida libre. Se ha visto que éstas se mantienen viables tanto a elevadas temperaturas como frente a la desecación (Fries, 1993; Fenoy *et al.*, 2009; Weiss y Becnel, 2014; Fadhilah *et al.*, 2022).

El ciclo de vida de los microsporidios consta de dos fases diferentes: la etapa de proliferación o merogonia y la etapa madura, coincidente con la etapa infecciosa o esporogonia (Fadhilah *et al.*, 2022) en donde se forma la espora.

En *A. mellifera*, la infección comienza cuando las abejas ingieren esporas maduras a través de alimentos contaminados o al estar en contacto con heces realizando tareas de limpieza. El microsporidio ingresa al organismo y se dirige al intestino, donde afecta únicamente a las células epiteliales del ventrículo, reflejando una infección tejido específica (Fries *et al.*, 1996).

El modo de acción, ya dentro del hospedero, consta en fijarse a las células blanco mediante una estructura denominada tubo polar y posteriormente inocular el esporoplasma infeccioso dentro del citoplasma (Fries, 1993; Fadhilah *et al.*, 2022). Este esporoplasma tiene la capacidad de dividirse y multiplicarse, produciendo esporoblastos que maduran convirtiéndose en esporas capaces de diseminarse hacia otras células o hacia el medioambiente a través de las heces (Fries, 1993; Fries *et al.*, 1996; Cornman *et al.*, 2009; Evans y Schwarz, 2011).

Se han descrito tres especies de *Nosema* capaces de infectar a *A. mellifera*: *N. apis*, *N. ceranae* y *N. neumanii* (Zander, 1909; Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006; Chemurot *et al.*, 2017). Actualmente *N. ceranae* es la especie de mayor preocupación para los apicultores por sus

implicancias en la salud de la colmena y por su dispersión a nivel mundial (Klee *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Urbietta-Magro *et al.*, 2019) (Figura 2). Se ha propuesto que este microsporidio saltó de hospedador en la década del 90, ya que originalmente se consideraba confinado a su hospedero asiático *A. ceranae*.

Puntualmente, *N. ceranae* actúa infectando las células epiteliales del intestino de las abejas, alterando su fisiología y propagándose entre estas rápidamente (Higes *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2009).

Diversos autores han reportado que las abejas infectadas están bajo estrés nutricional y energético, lo que se relaciona con una disminución en los niveles de carbohidratos y aminoácidos implicados en diversas vías bioquímicas. Además, interfiere en la capacidad de vuelo; tanto en la orientación para la entrada a la colmena, como en la duración de regreso (Kralj y Fuchs, 2010; Mayack y Naug, 2010; Aliferis *et al.*, 2012).

Por otro lado, también se ha visto que la infección por este patógeno altera la composición de la microbiota intestinal de las abejas, y suprime significativamente su respuesta inmune (Antúñez *et al.*, 2009; Rubanov *et al.*, 2019; Castelli *et al.*, 2020).

Todas estas alteraciones tienen graves consecuencias a nivel colonial, causando disminuciones importantes en el tamaño poblacional de la misma, el área de cría y la producción de miel, pudiendo incluso llevar al colapso repentino de la colonia (Higes *et al.*, 2008; Invernizzi *et al.*, 2009; Botías *et al.*, 2013).

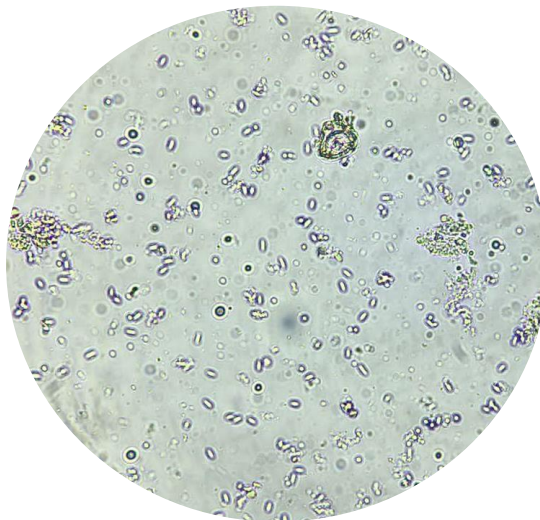


Figura 2. Esporas de *Nosema* spp. Imagen tomada por microscopía óptica a 400X.

4.4 Nutrición

La alimentación de las abejas melíferas consta de miel, néctar y polen, cada uno aportando ciertos nutrientes esenciales que deben ser incorporados para una correcta nutrición (Herbert *et al.*, 1977).

El néctar es una sustancia acuosa azucarada secretada por las plantas, cuya función principal es favorecer el mutualismo al recompensar a los polinizadores y, de este modo, involucrarlos en la polinización. En el caso de las abejas *A. mellifera*, es recolectado como fuente de carbohidratos y al llegar a la colmena lo almacenan en las celdas para transformarlo en miel. Este proceso consta de una serie de evaporaciones y deshidrataciones hasta reducir el contenido de agua a aproximadamente un 20% (Doner, 1977; Berenbaum y Calla, 2021).

La presión osmótica producida por las altas concentraciones de azúcares son las que permiten que la miel tenga fuertes propiedades antimicrobianas, útiles tanto para las abejas, como para nosotros (Jeddar *et al.*, 1985; Molan, 1992; Erler *et al.*, 2014). Por lo tanto, la miel no solo es una fuente de carbohidratos, como el néctar, sino que también posee otras diversas funciones.

El polen es la principal fuente de proteínas, minerales y lípidos para las abejas (Keller *et al.*, 2005). En relación al contenido proteico, se han descrito 10 aminoácidos esenciales para las abejas, que deben ser obtenidos de la alimentación ya que no pueden ser sintetizados. Estos son: arginina, histidina, lisina, triptófano, fenilalanina, metionina, treonina, leucina, isoleucina y valina (de Groot, 1953). Pólenes de diferentes orígenes pueden variar en el contenido y proporción de estos aminoácidos (Day *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 2005), es por esto que una correcta nutrición se logra con dietas poliflorales (Schmidt, 1984).

4.4.1 Estrés nutricional

Distintos autores han aportado evidencia sobre cómo la nutrición afecta a las abejas. Por un lado, es relevante la calidad de la dieta ya que la cantidad de proteína se correlaciona con el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas (Standifer *et al.*, 1960; Pernal y Currie, 2000; Keller *et al.*, 2005; Di Pasquale *et al.*, 2013). En dietas puramente de carbohidratos, las mismas permanecen subdesarrolladas. Las glándulas hipofaríngeas son un órgano de vital importancia ya que se encarga de la síntesis de jalea real; alimento de reina, larvas y zánganos (Wang y Moeller, 1969). Por otro lado, importa la diversidad del origen botánico del polen, ya que se ha observado que el estrés nutricional asociado al consumo de polen monofloral es una causa importante de despoblación de colmenas (Naug, 2009).

También se ha visto que en colonias que están bajo escasez de alimentos o incluso inanición las abejas modifican su comportamiento adelantando el forrajeo (Schulz *et al.*, 1998), pudiendo ser el agotamiento de los lípidos el desencadenante, ya que habitualmente la transición de la labor a búsqueda de alimento va asociada a reservas de lípidos reducidas (Toth *et al.*, 2005; Toth y Robinson, 2005).

Las abejas melíferas se caracterizan por tener una microbiota altamente conservada y relativamente sencilla, conformada por 9 grupos de especies bacterianas que conforman el 95 a 99,9% del total (revisado por Kwong y Moran, 2016). Esta microbiota es afectada por el estrés nutricional, el cual produce alteraciones en la abundancia de los diferentes componentes bacterianos, generando desequilibrios en esta comunidad (Castelli *et al.*, 2020). Sumado a esto, también se ve modificada la expresión de genes asociados a la inmunidad como la glucosa oxidasa, himenoptecina y lisozima (Alaux *et al.*, 2010; Castelli *et al.*, 2020). Estos factores mencionados anteriormente podrían asociarse a una menor resistencia a patógenos tales como virus y el microsporidio *N. ceranae* (Di Pasquale *et al.*, 2013; Dolezal *et al.*, 2019; Castelli *et al.*, 2020).

Por lo tanto, la diversidad y calidad de la dieta a la cual las abejas puedan acceder va a repercutir en su fisiología, comportamiento, microbiota y resistencia a patógenos entre otros, favoreciendo o perjudicando el desarrollo de la colmena, su producción de miel y la longevidad y supervivencia de sus integrantes (Schmidt *et al.*, 1987; Di Pasquale *et al.*, 2013).

4.5 *Apis mellifera* en Uruguay

Según el Registro Nacional de Propietarios de Colmenas (RNPC), el sector apícola en Uruguay se conforma por 2.638 apicultores y un total de 616.964 colmenas (datos correspondientes al año 2022, MGAP).

El 48% del total de las colmenas se concentra en los departamentos del litoral oeste como Soriano, San José, Paysandú, Río Negro y Colonia, siendo Montevideo el que concentra una menor cantidad de colmenas. Otra observación relevante que surge de los datos en relación a la distribución, es que a medida que aumenta el número de colmenas, disminuye la cantidad de propietarios, es decir, hay una mayor concentración de colmenas por propietario (datos del boletín de divulgación al 2021 del Sistema Nacional de Trazabilidad de productos apícolas).

En cuanto a las ventas, entre 2011 y 2020 Uruguay exportó en promedio 10.700 toneladas de miel al año. Aproximadamente el 90% de la miel producida en el país tiene como destino la exportación, siendo España (38% del volumen exportado), Estados Unidos (27%) y Alemania (12%) los principales destinos de la misma (anuario de Opya 2021).

Más allá de la importancia de la abeja melífera para la economía del país por la producción y exportación de miel, también es relevante su función como polinizador, ya que estudios han evidenciado que la misma aumenta los ingresos monetarios de ciertos cultivos en un 70%. En particular se ha visto un efecto significativo en la producción de manzana, girasol, tomate, pera y durazno, entre otros (Santos *et al.*, 2009).

Uno de los mayores desafíos para el sector apícola de Uruguay son los problemas sanitarios. Tanto el ácaro *V. destructor* como el microsporidio *N. ceranae* están distribuidos por todo el país y causan graves problemas en la salud de las abejas melíferas, repercutiendo en la mortandad de colonias y disminución de la producción de miel (Invernizzi *et al.*, 2011; Antúnez *et al.*, 2015) (Figura 3 y Figura 4, respectivamente).

Por un lado, *V. destructor* se detectó en el país en 1978 en el departamento de Montevideo, dispersándose rápidamente al resto de las localidades. Por más que al comienzo no era estrictamente necesario el control con acaricidas, en la actualidad los apicultores deben optar por esta opción para evitar perder sus colonias, con algunas excepciones en el este del país (Invernizzi *et al.*, 2011; Anido *et al.*, 2015; comunicación personal con Palacios, 2021). Por otro lado, en relación a *Nosema* spp. se sabe que está en el país desde, como mínimo, el 1990, siendo *N. ceranae* la única especie encontrada hasta la actualidad. Previo a esta fecha había reportes de nosemosis, pero no se sabía que especie era la causante, se asumía que era *N. apis* (Invernizzi *et al.*, 2009; Anido *et al.*, 2015; comunicación personal con Palacios, 2021).

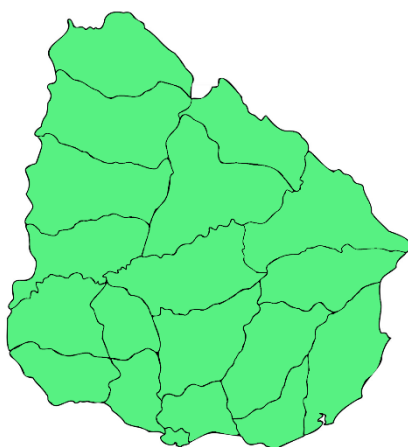


Figura 3. Distribución del ácaro *V. destructor* en Uruguay. Se indica en color verde las zonas en donde se detectó la presencia del ectoparásito. Fuente: Modificado de Anido *et al.*, 2015.

Una de las posibles explicaciones a este fenómeno es la deficiencia nutricional a la cual se ven expuestas las abejas melíferas en este contexto. Se ha visto que a medida que transcurre el periodo de floración de *E. grandis*, la diversidad botánica de los pólenes disponibles para las abejas disminuye, hasta quedar únicamente el de esta especie, condicionando a las abejas a una dieta monofloral. Además, esta especie de polen comienza teniendo un buen porcentaje bruto de proteína (entre el 20 y el 30%), pero disminuye paulatinamente hasta valores inferiores al 20% al final de la floración (Santos *et al.*, 2009; Invernizzi *et al.*, 2011; Branchiccela, 2020) considerándose valores insuficientes para una correcta nutrición de las abejas (Kleinschmidt y Kondos, 1976).

4.6 Antecedentes

El ensayo fue realizado en una forestación de *E. grandis* porque ya se ha reportado como un ambiente ideal para estudiar el efecto del estrés nutricional en las abejas (Branchiccela *et al.*, 2019). En estas condiciones, las abejas se alimentan mayoritariamente del polen de esta especie el cual es deficiente en varios aspectos nutricionales. Por un lado, el porcentaje bruto de proteína disminuye durante la floración, llegando a valores menores al 20%, recomendado para una correcta nutrición (Kleinschmidt y Kondos, 1976; Santos *et al.*, 2009; Invernizzi *et al.*, 2011; Branchiccela *et al.*, 2019). A su vez, tiene bajo contenido de lípidos (Manning, 2001; Branchiccela *et al.*, 2019); alta relación de omega 6-3 (Arien *et al.*, 2015; Arien *et al.*, 2020), y tiene desbalance en la proporción de aminoácidos esenciales (Branchiccela *et al.*, 2020), principalmente isoleucina (Somerville, 2001; Somerville y Nicol, 2006). Todas estas características hacen que una dieta basada principalmente en el polen de *E. grandis* sea deficiente y, por tanto, genere estrés nutricional.

En trabajos previos observamos que la suplementación de las colonias con una torta de polen polifloral durante su estadía en la forestación de *E. grandis*, o antes y durante, generó un aumento de la fortaleza de la colmena (Branchiccela *et al.*, 2019; Viera, 2021). Sin embargo, el uso de tortas de polen polifloral puede ser trabajoso para los apicultores porque implica coleccionar el polen en momentos donde hay exceso y almacenarlo adecuadamente para posteriormente preparar y administrar las tortas. Además, el efecto observado podría variar en base a la composición botánica del polen empleado. Esta vez decidimos profundizar en esta temática, pero evaluando también suplementos comerciales listos para su uso.

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1 Hipótesis

La suplementación proteica de colonias de abejas *Apis mellifera*, antes de su traslado y durante su estadía en plantaciones de *Eucalyptus grandis*, influye en su salud, fortaleza y productividad.

5.2 Objetivo general

El objetivo general es evaluar el efecto de diferentes suplementos nutricionales comerciales (Feedbee y Apiprot) y caseros (torta casera, torta de polen polifloral) como estrategia para mejorar la fortaleza, nutrición y productividad de abejas melíferas en colmenas emplazadas en una forestación de *Eucalyptus grandis*.

5.3 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Evaluar el efecto de la suplementación nutricional, con diferentes productos, en la fortaleza de la colmena.
2. Evaluar el efecto de dichos productos en la productividad de miel.
3. Determinar el efecto en el nivel de infección por el microsporidio *Nosema ceranae*.
4. Determinar el efecto en el estado nutricional de las abejas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Para llevar a cabo este trabajo se empleó un apiario comercial perteneciente al apicultor Federico Coll localizado en Colonia, Uruguay, con 100 colmenas. Antes de comenzar el estudio las colmenas se estandarizaron, en cuanto a población de abejas adultas, cría y reservas de miel (Figura 5).

El primero de febrero de 2022 las colmenas se dividieron en 5 grupos de 20 colmenas cada uno y se administraron los diferentes tratamientos: suplementación con una torta de polen polifloral, suplementación con el producto comercial Apiprot, suplementación con el producto comercial Feedbee, suplementación con una torta de preparación casera y finalmente un grupo no recibió tratamiento, como control.

Apiprot PLUS® y Feedbee® son suplementos nutricionales diseñados para las abejas, que se encuentran disponibles en el mercado nacional. Son generados en base a proteínas y carbohidratos. Se contactó a los productores/representantes de estos productos y en ambos casos accedieron a participar en el estudio.

La torta de preparación casera se diseñó y preparó en conjunto con INIA, La Estanzuela, en base a las necesidades nutricionales de las abejas. Por último, la torta de polen polifloral consistió en una mezcla de polen ensilado de diferentes colmenas mezclado con jarabe de azúcar (15 partes de polen: 1 parte de jarabe) (ver en anexo más detalles de los productos utilizados).

Dado que todos los suplementos tienen diferentes porcentajes de proteína, se estandarizaron entre ellos con el fin de obtener tortas de cada producto con 20 gramos de proteína cruda. El peso total de cada suplemento fue: polen polifloral 250 gramos, Apiprot 234 gramos, Feedbee 91 gramos y torta casera 100 gramos.

La aplicación de cada suplemento se llevó a cabo en tres ocasiones, con un intervalo de 14 días entre ellas, en las siguientes fechas: 04/02/2022, 18/02/2022 y 04/03/2022. Después de 27 días, se realizaron una cuarta y una quinta aplicación aproximadamente cada 30 días, en las fechas siguientes: 31/03/2022 y 04/05/2022. En todos los casos, las aplicaciones se realizaron directamente sobre la cámara de cría de cada colmena.

A finales del verano (22/02/2022) las 100 colmenas se trasladaron a una forestación de *E. grandis* en Rivera, Uruguay, y se mantuvieron allí durante aproximadamente 2,5 meses (hasta el 08/05/2022), para luego ser trasladadas de vuelta a Colonia, Uruguay.

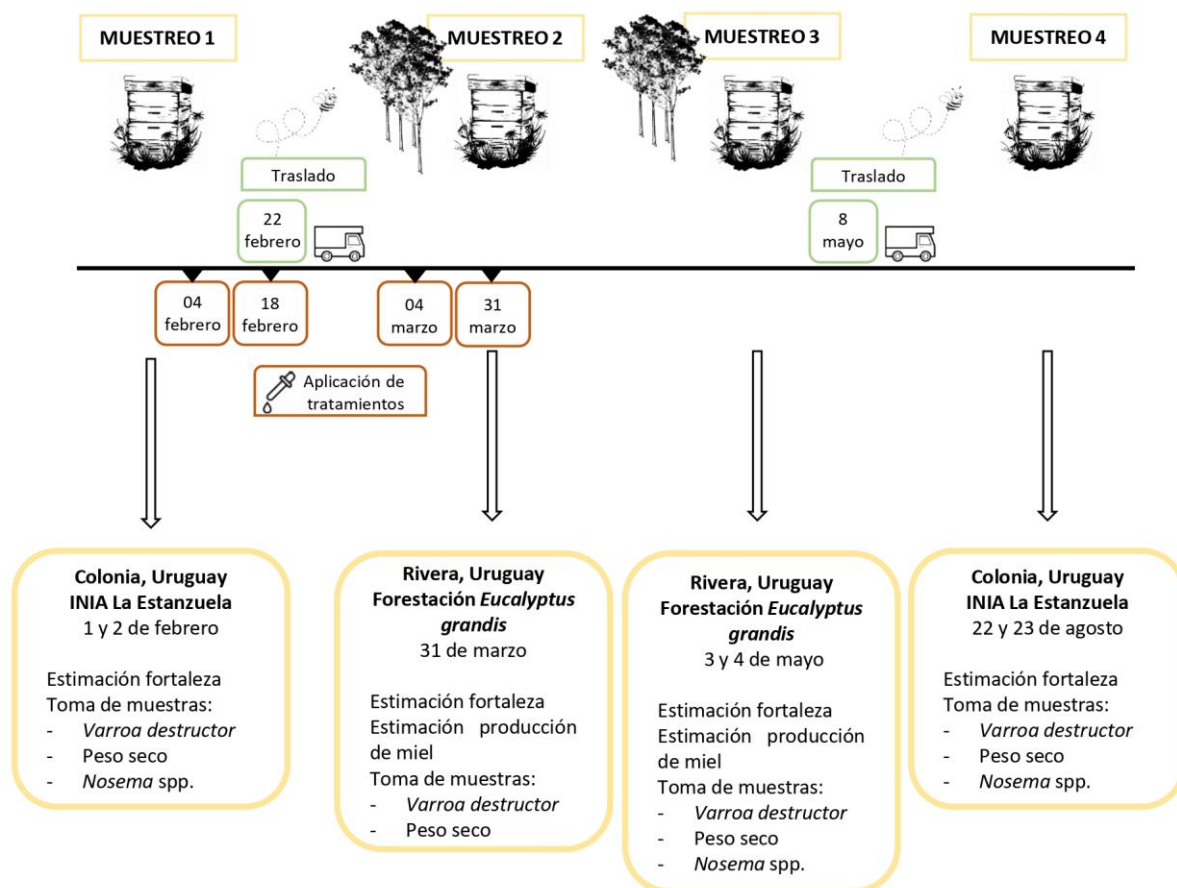


Figura 5. Esquema representativo del ensayo de campo realizado para evaluar el efecto de la suplementación nutricional en la salud, fortaleza y productividad de colmenas de abejas melíferas.

Al inicio del ensayo (01 y 02/02/2022, muestreo 1), durante la floración de los eucaliptos (31/03/2022, muestreo 2), al finalizar la floración (03 y 04/05/2022, muestreo 3) y a fines del invierno (22 y 23/08/2022, muestreo 4) se inspeccionaron las colmenas y se evaluó la fortaleza. Además, se tomaron muestras de todas las colmenas: abejas pecoreadoras para analizar el nivel de infección con *Nosema* spp. y abejas nodrizas para evaluar el nivel de infestación con *V. destructor* y el peso de las abejas como parámetro de estado nutricional. Como excepción, por lo complejo del muestreo durante la forestación, en el muestreo 2 solo se colectaron muestras de 12 de las 20 colmenas por grupo, seleccionadas al azar y no se colectaron abejas para el análisis de *Nosema* spp.

Durante y al final de la floración de los eucaliptos (muestreo 2 y 3) se estimó la producción de miel.

6.2 Preparación de las tortas

Para la preparación de la torta de polen polifloral se tomaron cuadros con polen de diversos orígenes botánicos. El mismo, el cual fue extraído con una maquina creada con dicho fin, fue mezclado con jarabe de sacarosa al 50% en una relación 15:1 formando así una pasta.

En cuanto a la torta casera, se preparó en INIA La Estanzuela, Colonia. La misma aporta lípidos, carbohidratos y proteína.

Por último, los productos comerciales, Apiprot PLUS® y Feedbee®, se consiguieron directamente con los responsables de su venta en el mercado nacional. Apiprot PLUS® se mezcló con una determinada proporción de jarabe según las indicaciones del responsable.

6.3 Evaluación de la fortaleza de la colmena

Para evaluar la fortaleza de la colmena, se estimó la población adulta y el área de cría según el método de estimación subjetivo descrito en el Beebook (Delaplane *et al.*, 2013). Para estimar la población adulta, se tomó en cuenta el número de “calles” (espacio entre dos cuadros) cubierto por abejas (cada calle con abejas equivale a dos caras de cuadro cubiertos por abejas). Para estimar la cría, se observó el porcentaje de cara de cuadro cubierto por cría, dichos porcentajes se sumaron en cada colmena. Esto se realizó en todos los cuadros que tenían cría. Para calcular la cantidad de cría se consideró el área de cada cara de cuadro y la cantidad de celdas en dicha área.

En todos los muestreos realizados, los mismos dos observadores realizaron esta tarea de forma paralela y se realizó un promedio de las dos observaciones.

6.4 Estimación de la producción de miel

Para estimar la producción de miel se pesaron las colmenas con reservas de miel y se restó el peso del material de madera (cajones, 10 kilogramos cada uno y techos).

6.5 Determinación del nivel de infección por *V. destructor*

Para determinar el porcentaje de infestación por el ácaro *V. destructor* se utilizó una modificación del protocolo sugerido en el Beebook (Dietemann *et al.*, 2013). Se colocaron entre 100 y 200 abejas nodrizas en el recipiente “easy check” (Figura 6), se las cubrió con agua tibia más 2 o 3 gotas de jabón líquido y se sacudió enérgicamente durante 1 minuto. El jabón actúa reduciendo la tensión superficial del líquido y, entonces, facilita la penetración entre las partes del cuerpo del ácaro y las abejas, favoreciendo su desprendimiento. Este recipiente posee un colador que al sacudir las abejas permite la separación física de las abejas y los ácaros. Posteriormente se contabilizó visualmente el número de abejas y ácaros presentes (Figura 7). Para estimar el porcentaje de infección, se calculó la proporción de abejas en relación a la de ácaros.

Este análisis se realizó solo en 5 colmenas por tratamiento, seleccionadas al azar. Se mantuvieron las mismas colmenas a lo largo del experimento.



Figura 6. Recipiente conocido como “easy check” utilizado para determinar el nivel de infección con *V. destructor*.



Figura 7. Proceso de trabajo para determinar el nivel de infección con *V. destructor*. Dentro del círculo de color rojo, se ve un ácaro.

6.6 Determinación del nivel de infección por *Nosema* spp.

Para analizar el nivel de infección con el microsporidio *Nosema* spp. se siguió el protocolo sugerido en el Beebook (Fries *et al.*, 2013). Se separó el abdomen de 60 abejas del resto del cuerpo utilizando una pinza (Figura 8), para luego homogeneizarlos en 60 mL de agua destilada estéril utilizando un Stomacher (Figura 9), a máxima potencia por 120 segundos.

Para el conteo de las esporas se utilizó un microscopio óptico 400X utilizando una cámara de Neubauer (improved).



Figura 9. Partes del cuerpo de la abeja (cabeza, tórax, abdomen), observando dentro del círculo rojo el abdomen.



Figura 8. Herramienta conocido como “Stomacher” utilizada para determinar el nivel de infección con *Nosema* spp..

6.7 Determinación de la especie de *Nosema*

6.7.1 Obtención de muestras de abejas

Con el objetivo de determinar la especie de *Nosema* presente en las colmenas, se seleccionaron al azar 4 colmenas, se tomaron 5 abejas por colmena y se realizó un pool. Para este análisis se utilizaron las muestras correspondientes al muestreo 3 (fin de la floración), por ser el momento donde se espera el mayor nivel de infección por este microsporidio.

6.7.2 Extracción de ADN

Se homogeneizaron las 20 abejas en 10ml de PBS estéril en el Stomacher durante 120 segundos a máxima velocidad. El homogeneizado resultante se filtró utilizando gasas para eliminar restos del esqueleto de la abeja, y se centrifugó a 10.000xg durante 10 minutos. Teniendo en cuenta el tamaño de las esporas de *Nosema* spp. (entre 3 a 6 μm de largo y 2 a 4 μm de ancho aproximadamente) y el paso previo de centrifugación, donde los componentes más densos se desplazan hacia el fondo por acción de la fuerza centrífuga, se espera que estas se localicen en el pellet (Fries *et al.*, 1996). Por tanto, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1ml de PBS estéril. Se siguió el protocolo de purificación de esporas por filtración según Rodríguez-García *et al.*, 2018.

La extracción de ADN de la preparación previamente descrita se llevó a cabo mediante un kit comercial (*QIAamp® DNA Mini and Blood Mini, Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está pensado para primero realizar la lisis de la muestra liberando las células y el material genético de las mismas. Luego se pasa a columnas de sílice en donde se busca que se adsorba el ADN en condiciones de alta salinidad. Se hacen lavados para eliminar impurezas y, por último, una elución para recuperar el ADN de la columna de sílice, obteniéndolo purificado.

6.7.3 Amplificación del ADN mediante PCR múltiplex

Las esporas de *N. ceranae* y *N. apis* son muy similares morfológicamente por lo que su identificación se realizó mediante multiplex PCR, técnica que permite incorporar múltiples cebadores que amplifican regiones de ADN de manera simultánea en una sola reacción. Se emplearon *primers* específicos para un fragmento que codifica para el gen 16S de *N. apis* y de *N. ceranae*, de acuerdo a lo descrito por Martin-Hernández *et al.*, 2007.

Los primers utilizados para *Nosema apis* fueron forward 5' -GGG GGC ATG TCT TTG ACG TAC TAT GTA- 3' y reverse 5' -GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA ACA ACT ATG- 3' que logran amplificar un fragmento de 321 pares de bases, y para *Nosema ceranae* se usaron los primers forward 5' -CGG CGA CGA TGT GAT ATG AAA ATA TTA A- 3' y reverse 5' -CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA AAC CG- 3' para amplificar un fragmento de 218-219 pares de bases.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50µl conteniendo 5µl de buffer PCR 10X, 3µl de MgCl₂, 50mM, 2µl de dNTPs, 10mM, 0,4µl de cada cebador a 50µM correspondiente a *N. ceranae* y *N. apis*, 0,4µl de Taq ADN polimerasa (5U/µl) y 5µl de ADN molde. Para llegar al volumen final, se agregó lo que resta (33µl) de agua destilada.

El protocolo de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguido por 10 ciclos de 94°C por 15 segundos, 61,8°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos. Luego se agregaron 20 ciclos más de lo descrito anteriormente, pero agregando 5 segundos al último paso en cada uno de los 20 ciclos. Por último, una extensión de 72°C por 7 minutos. Dichas amplificaciones se realizaron usando un termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet).

En la corrida de PCR se usaron controles positivos para *N. ceranae* y *N. apis* y un control negativo donde no se incorporó ADN.

6.7.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de la reacción de PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 2% en TBE 0,5X., a 110V durante 40 min. Los amplicones se visualizaron mediante tinción con Gel Red y se visualizaron mediante exposición a luz UV. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador de tamaño 1 Kb (Fermentas).

6.8 Estimación del peso seco de las abejas

Para evaluar el estado nutricional de las abejas se utilizó el peso seco de la cabeza como marcador del desarrollo de las glándulas hipofaríngeas (Crailsheim y Hrassnigg, 1998). Estas glándulas cumplen la función de sintetizar la jalea real; alimento de reina, larvas y zánganos (Wang y Moeller, 1969). Se ha visto que la disponibilidad de alimentos, principalmente el contenido de proteína del polen y su calidad, afecta el desarrollo de las mismas, razón por la cual sirven como marcador nutricional (Ahmad *et al.*, 2021).

También se estimó el peso seco del tórax de las abejas, por estar asociado al desarrollo de la musculatura alar. Esta característica es utilizada como marcador nutricional (Brodschneider *et al.*, 2009).

Para la determinación de peso seco de cabeza y tórax se utilizaron 30 abejas nodrizas por colmena, de 5 colmenas por tratamiento. En total se analizaron 150 abejas por tratamiento. Para esto se separó la cabeza y el tórax de las abejas utilizando una pinza y se colocaron en grupos de 30 en placas de Petri. Luego se las dejó secar en la estufa a 55 - 60°C durante 3 días, y se pesaron de forma individual en la balanza analítica.

6.9 Obtención y almacenamiento de muestras

Para evaluar el nivel de infección con *Nosema* spp., se seleccionaron abejas pecoreadoras, es decir, aquellas encargadas de recolectar néctar y polen. Estas abejas fueron recolectadas usando un frasco en áreas alejadas de la cámara de cría. En contraste, para analizar el nivel de infección con *V. destructor* y el estado nutricional, se tomaron muestras de abejas nodrizas, responsables del cuidado de la cría y la limpieza de la colmena. Estas abejas fueron recolectadas en las proximidades del nido de cría.

Durante la colecta de abejas para la detección y cuantificación de patógenos, las abejas fueron sumergidas en alcohol 95°, donde también se almacenaron posteriormente. Para el análisis del estado nutricional, las abejas se colocaron en bolsas selladas.

Todas las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4°C.

6.10 Estimación del consumo

Para estimar el consumo de cada tratamiento aplicado se pesó, en los casos que existió, el sobrante de cada torta. En estos casos, el excedente no se retiró, sino que se dejó en la colmena junto con la nueva aplicación (cuando correspondía).

La tercera aplicación de los tratamientos (04/03/22) la hizo un apicultor particular por lo que en esa ocasión no se pudo pesar lo correspondiente a la segunda aplicación (18/02/22).

6.11 Análisis de los resultados

Para evaluar el efecto de la suplementación nutricional en la salud, fortaleza y productividad de las colmenas, se incluyeron en el análisis estadístico sólo aquellas colmenas que sobrevivieron hasta el final de la floración (muestreo 1: $n = 80$, muestreo 3: $n=80$). En el caso del muestreo 2, por lo complejo del muestreo durante la floración, solo se colectaron muestras de 12 de las 20 colmenas por grupo, seleccionadas al azar (muestreo 2: $n = 52$).

Para evaluar el efecto a largo plazo, se analizaron todas aquellas colmenas que sobrevivieron hasta agosto (muestreo 4, $n=66$).

En primer lugar, se verificó que todos los datos (población de abejas, cantidad de cría, peso seco de tórax y abdomen, nivel de infección por *Nosema* spp. y *V. destructor*) cumplan con los supuestos de estadística paramétrica: independencia, aleatoriedad, normalidad y homogeneidad de varianza. La normalidad se evaluó mediante el test de Shapiro Wilks y la homogeneidad de varianza se determinó mediante el Test de Levene.

Aquellos datos que cumplieron con los supuestos de estadística paramétrica se analizaron mediante el test de Student para muestras pareadas, mientras que los que no cumplieron con los supuestos, se analizaron mediante el test de Wilcoxon para muestras pareadas. Se realizaron comparaciones pareadas entre el grupo control (sin tratamiento) y los grupos a los que se les administraron los diferentes suplementos nutricionales.

En todos los casos se consideró un nivel de confianza del 95% y todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el Software RStudio.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la fortaleza de la colmena

Se evaluó el impacto de diferentes suplementos nutricionales comerciales y caseros en la fortaleza de la colmena, en base a la población de abejas adultas y la cantidad de cría. Al inicio del ensayo, todas las colmenas presentaron una población de abejas adultas similar (Test de Student, comparaciones pareadas entre el control y los diferentes grupos, polifloral p valor = 0,67; Apiprot p valor = 0,65; Feedbee p valor = 0,55 y torta de preparación casera p valor = 0,42) (Figura 9 - Muestreo 1).

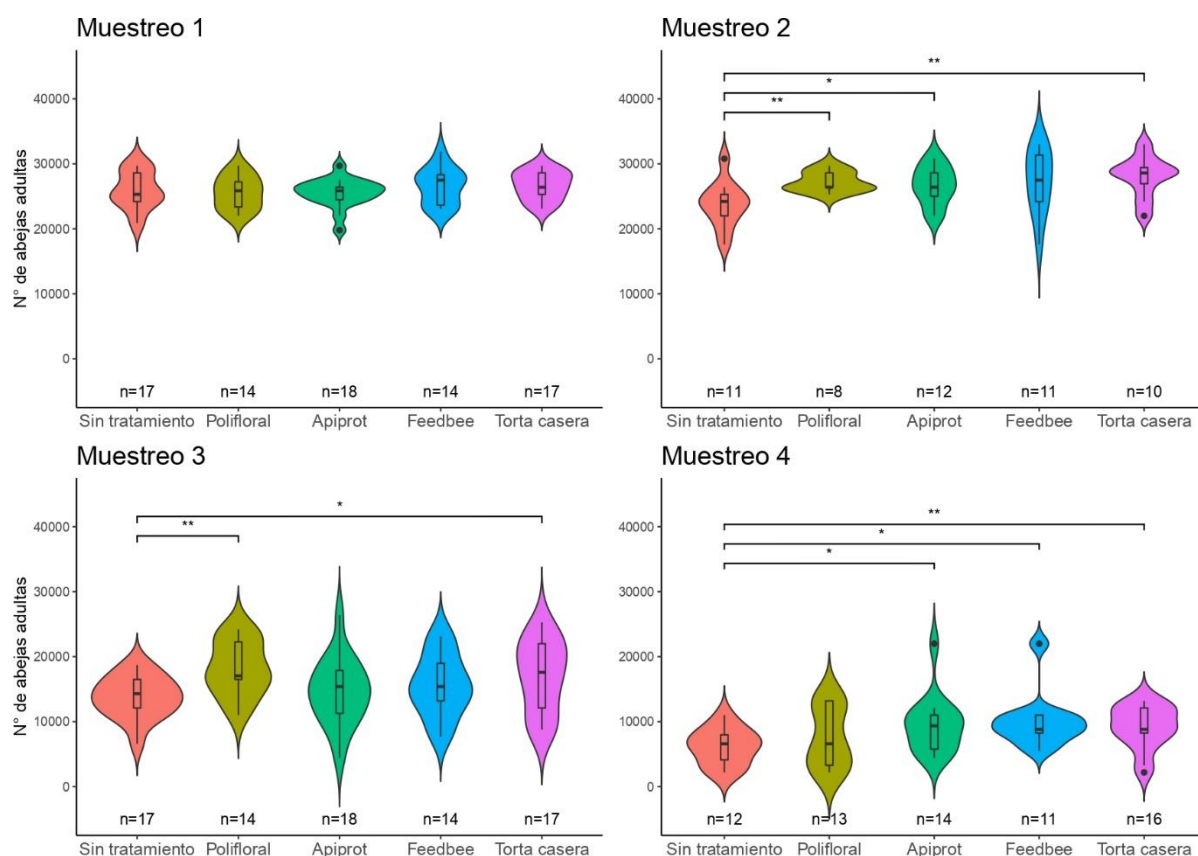


Figura 9. Efecto de la suplementación nutricional con torta polifloral, Apiprot, Feedbee y torta casera sobre la población de abejas adultas. Se muestra el número de abejas adultas al inicio del ensayo (muestreo 1), al inicio y final la floración (muestréos 2 y 3) y a largo plazo, en invierno (muestro 4). Se indican las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al grupo no suplementado (sin tratamiento), con una barra horizontal negra (*: p valor $\leq$ 0,05; **: p valor $\leq$ 0,01; ***: p valor $\leq$ 0,001). Los violin plots incluyen todas las características presentes en un boxplot, como los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75, y la mediana e incorporan un diagrama de densidad de los datos que se encuentra rotado en cada lado del gráfico.

Las colmenas que recibieron torta polifloral presentaron mayor población de abejas adultas durante la floración de *E. grandis* (muestreo 2 y 3) respecto al grupo control sin tratamiento (Test de Student, p valor = 0,01 y p valor = 0,003; respectivamente). Estos efectos no perduraron en el tiempo ya que no se observaron luego de terminada la floración, evaluado en invierno (muestreo 4) (Test de Wilcoxon, p valor = 0,6) (Figura 9).

Las colmenas tratadas con el producto comercial Apiprot, presentaron una población adulta significativamente mayor respecto al grupo control al inicio de la floración (muestreo 2) y luego de finalizada la misma, en invierno (muestreo 4) (Test de Student, p valor = 0,05; Test de Wilcoxon, p valor = 0,04 respectivamente) (Figura 9).

Respecto al producto comercial Feedbee, su administración generó cambios recién en el último muestreo, en invierno (muestreo 4), donde se observó una mayor población de abejas adultas respecto al grupo control (Test de Wilcoxon, p valor = 0,02) (Figura 9).

Por último, las colmenas que recibieron una torta de preparación casera mostraron una población adulta significativamente mayor tanto durante la floración (muestreo 2 y 3) como al final de la misma, en invierno, comparado con el grupo control (muestreo 4, Test de Student, p valor = 0,009; p valor = 0,05 y Test de Wilcoxon, p valor = 0,01, respectivamente) (Figura 9).

Al evaluar la dinámica de la población de abejas adultas en el transcurso del tiempo, se observa una disminución significativa desde febrero (muestreo 1) a mayo, final de la floración (muestreo 3) (sin tratamiento Wilcoxon test: p valor < 0,001; polen polifloral Test de Student: p valor < 0,001; Apiprot Wilcoxon test: p valor < 0,001; Feedbee Test de Student: p valor < 0,001 y torta de preparación casera Wilcoxon test: p valor < 0,001).

En relación a la cantidad de cría, al inicio del ensayo todos los grupos presentaron valores similares (Test de Student, comparaciones pareadas entre el control y los diferentes grupos, polifloral p valor = 0,56; Apiprot p valor = 0,43; Feedbee p valor = 0,73 y torta casera p valor = 0,63) (Figura 10 - Muestreo 1).

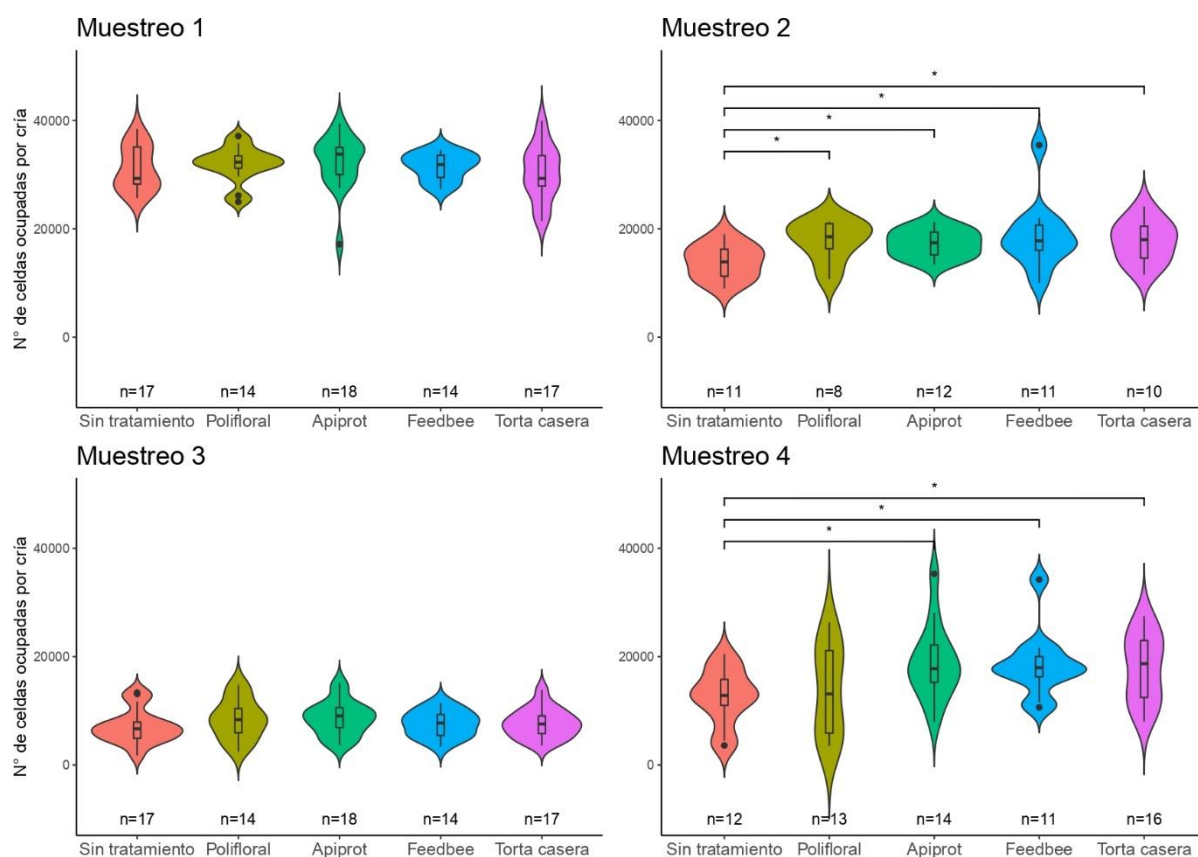


Figura 10. Efecto de la suplementación nutricional con torta polifloral, Apiprot, Feedbee y torta casera sobre la cantidad de cría. Se muestra este dato al inicio del ensayo (muestreo 1), al inicio y final de la floración (muestreos 2 y 3) y a largo plazo, en invierno (muestreo 4). Se indican las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al grupo no suplementado (sin tratamiento), con una barra horizontal negra (*: p valor $\leq$ 0,05; **: p valor $\leq$ 0,01; ***: p valor $\leq$ 0,001). Los *violin plots* incluyen todas las características presentes en un *boxplot*, como los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75, y la mediana e incorporan un diagrama de densidad de los datos que se encuentra rotado en cada lado del gráfico.

Las colmenas suplementadas con la torta de polen polifloral mostraron una mayor cantidad de cría al inicio de la floración de *E. grandis* (muestreo 2) comparado con el grupo control (Test de Wilcoxon, p valor = 0,03). Este efecto no se mantuvo ya que en invierno no se vieron diferencias significativas (muestreo 4, Test de Student, p valor = 0,6) (Figura 10).

En relación al producto comercial Apiprot, las colmenas tratadas presentaron mayor cantidad de cría respecto al grupo control, tanto al inicio de la floración (muestreo 2) como en invierno (muestreo 4, Test de Wilcoxon, p valor = 0,02 y Test de Student, p valor = 0,02 respectivamente) (Figura 10).

En cuanto al tratamiento con el producto comercial Feedbee, las colmenas tratadas también presentaron mayor cantidad de cría en relación al grupo control, al comienzo de la floración (muestreo 2, Test de Wilcoxon, p valor = 0,03) y en invierno (muestreo 4, Test de Student, p valor = 0,02) (Figura 10).

Por último, las colmenas que recibieron la torta de preparación casera también presentaron mayor cantidad de cría que el grupo control al inicio de la floración (muestreo 2) y en invierno (muestreo 4, Test de Wilcoxon, p valor = 0,03 y Test de Student, p valor = 0,02 respectivamente) (Figura 10).

Al analizar la cría en el transcurso del tiempo, se observa, al igual que en la población de abejas adultas, una disminución significativa entre febrero (muestreo 1) y mayo (muestreo 3) (Test de Student, comparaciones pareadas: sin tratamiento M1 – M3 p valor < 0,001; polen polifloral M1 – M3 p valor < 0,001; Apiprot M1 – M3 p valor < 0,001; Feedbee M1 – M3 p valor < 0,001 y Wilcoxon test: torta de preparación casera M1 – M3 p valor < 0,001).

7.2 Producción de miel

Se estimó la producción de miel al inicio de la floración de *E. grandis* (muestreo 2), la cual luego fue cosechada. Al final de la floración (muestreo 3) no se observó producción de miel, por eso solo se pudo considerar la producción del muestreo 2.

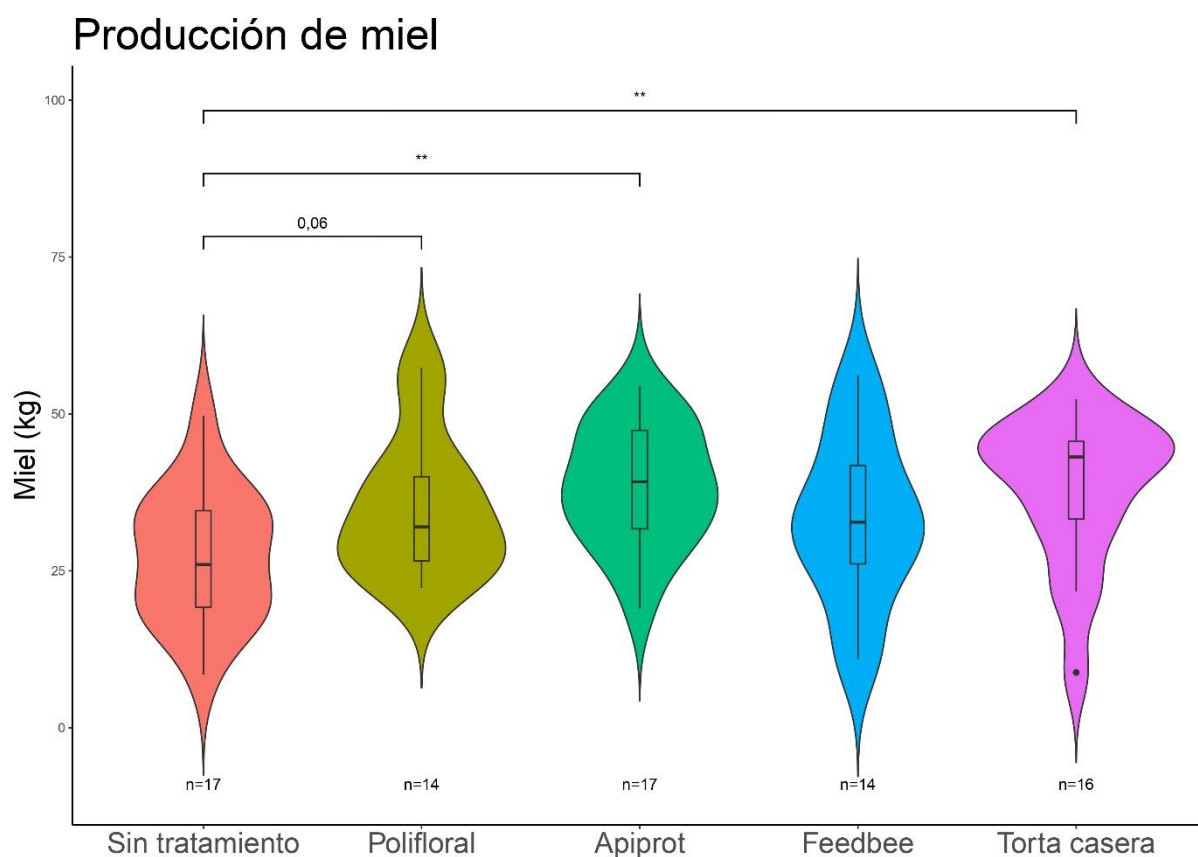


Figura 11. Efecto de la suplementación nutricional con torta polifloral, Apiprot, Feedbee y torta casera sobre la producción de miel, medida en kilogramos, de colmenas emplazadas en una forestación de *Eucalyptus grandis* en el departamento de Rivera al inicio de la floración (muestreo 2). Se indican las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al grupo no suplementado (sin tratamiento), con una barra horizontal negra (*: p valor $\leq 0,05$; **: p valor $\leq 0,01$; ***: p valor $\leq 0,001$). Los *violin plots* incluyen todas las características presentes en un *boxplot*, como los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75, y la mediana e incorporan un diagrama de densidad de los datos que se encuentra rotado en cada lado del gráfico.

Al inicio de la floración (muestreo 2) se observó una mayor producción de miel en aquellas colmenas suplementadas con el producto comercial Apiprot y con la torta de preparación casera en relación al grupo control (Test de Student, comparaciones pareadas Apiprot p valor = 0,01 y torta casera p valor = 0,003). En relación a las colmenas suplementadas con polen polifloral, se observó una tendencia hacia una mayor producción de miel respecto al grupo

control (Test de Student, comparaciones pareadas polen polifloral p valor = 0,06). Por último, al analizar la producción de miel de aquellas colmenas suplementadas con el producto comercial Feedbee, no se observaron diferencias significativas con respecto a las colmenas del grupo control (Test de Student, comparaciones pareadas p valor = 0,19) (Figura 11).

Más allá de lo mencionado anteriormente, se observa una producción de miel de aproximadamente 10 kilos más en todos los grupos que fueron suplementados en relación al grupo control (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio y desvío estándar de la producción de miel de las colmenas sometidas a diferentes tratamientos, estimado en el muestreo 2.

Tratamiento	Promedio de producción de miel
Sin tratamiento	27,3 ± 10,5
Polen polifloral	35 ± 11
Apirot	38,4 ± 9,6
Feedbee	33,1 ± 13,2
Torta casera	37,9 ± 11,7

7.3 Infección por *Varroa destructor*

En relación al porcentaje de infección con el ácaro *V. destructor*, este se mantuvo siempre por debajo del 4%. Además, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (polen polifloral, Apirot, Feedbee y torta casera) y el grupo control (sin tratamiento) en ninguno de los cuatro muestreos (muestreo 1, muestreo 2, muestreo 3 y muestreo 4) (Figura 12).

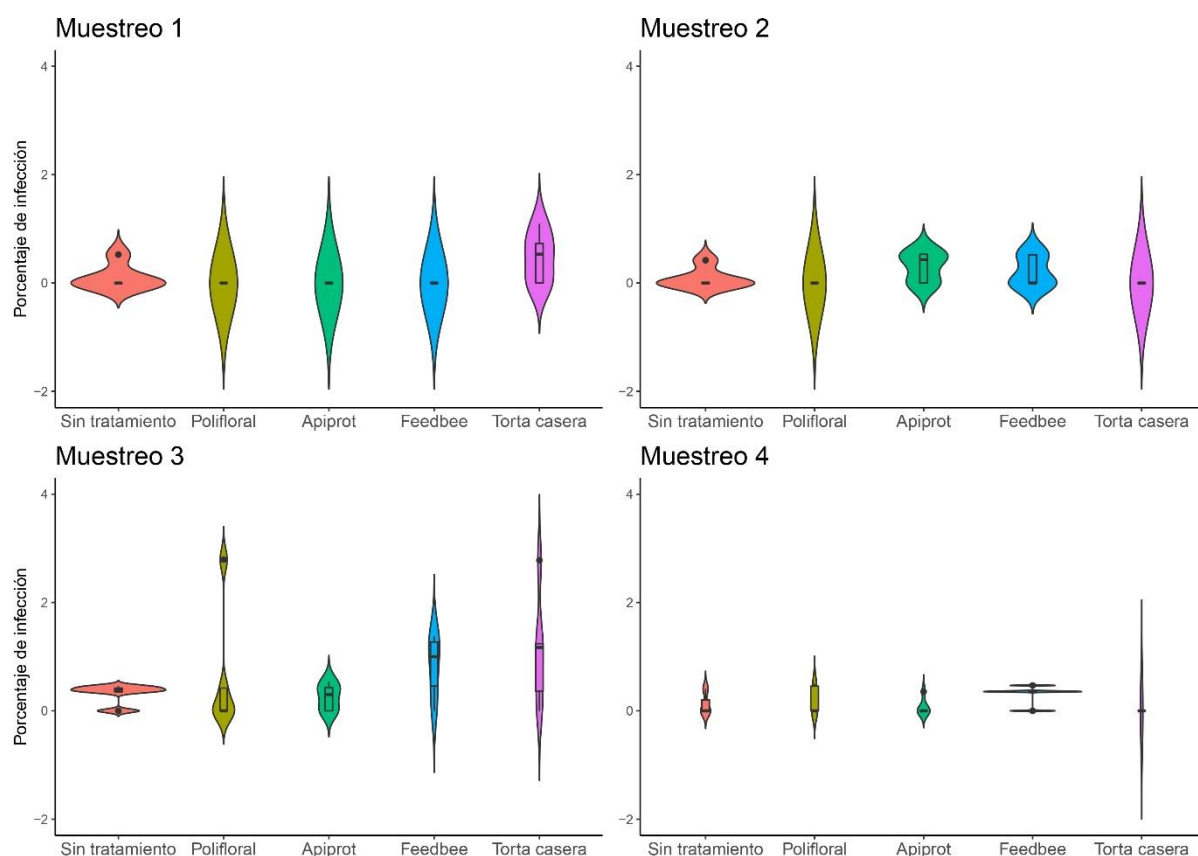


Figura 12. Porcentaje de infección con el ácaro *V. destructor* a lo largo de todo el ensayo (muestreo 1, muestreo 2, muestreo 3 y muestreo 4), considerando los grupos: sin tratamiento, polen polifloral, Apiprot, Feedbee y torta de preparación casera. Los *violin plots* incluyen todas las características presentes en un *boxplot*, como los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75, y la mediana e incorporan un diagrama de densidad de los datos que se encuentra rotado en cada lado del gráfico.

7.4 Infección por *Nosema* spp.

Al inicio del ensayo (muestreo 1) el número de esporas de *Nosema* spp. por abeja fue similar entre los diferentes grupos de colmenas (Wilcoxon test, comparaciones pareadas sin tratamiento - polifloral p valor = 0,7; Apiprot p valor = 0,8; Feedbee p valor = 0,7 y torta casera p valor = 0,56). El traslado de las colmenas a la forestación de *E. grandis* generó un aumento significativo en la infección por este microsporidio a lo largo del tiempo en todas las colmenas, sin importar el tratamiento (Wilcoxon test, comparaciones pareadas, sin tratamiento M1 – M3 p valor < 0,001; polifloral M1 – M3 p valor < 0,001; Apiprot M1 – M3 p valor < 0,001; Feedbee M1 – M3 p valor < 0,001; torta casera M1 – M3 p valor < 0,001).

La administración de los diferentes suplementos nutricionales no se relacionó con el número de esporas de *Nosema* spp. (muestreo 3: Wilcoxon test, comparaciones pareadas con el grupo

control - polifloral p valor = 0,78; Apiprot p valor = 0,53; Feedbee p valor = 0,8 y torta casera p valor = 0,62; Muestreo 4: Wilcoxon test, comparaciones pareadas con el grupo control - polifloral p valor = 0,73; Apiprot p valor = 0,51; Feedbee p valor = 0,77 y torta casera p valor = 0,25) (Figura 13).

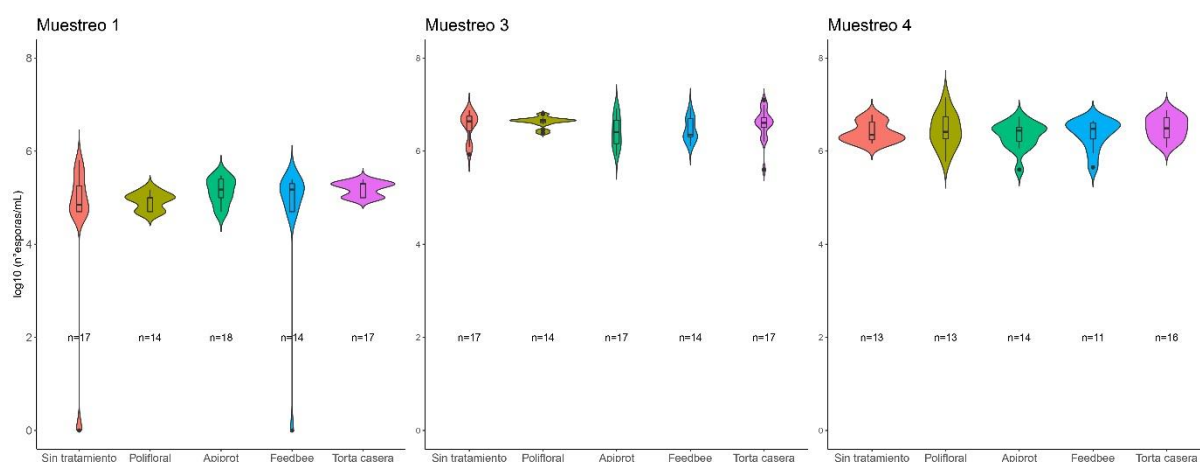


Figura 13. Efecto de la suplementación nutricional en la infección por *Nosema* spp. Grupos: sin tratamiento, polen polifloral, Apiprot, Feedbee y torta de preparación casera. No se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron tratamientos y el grupo no suplementado (sin tratamiento) en ninguno de los muestreos (muestreo 1, muestreo 3 y muestreo 4). Los violin plots incluyen todas las características presentes en un boxplot, como los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75, y la mediana e incorporan un diagrama de densidad de los datos que se encuentra rotado en cada lado del gráfico.

7.5 Determinación de la especie de *Nosema*

Se determinó la/las especies de *Nosema* presentes en una muestra compuesta con abejas de diferentes colmenas, colectadas en el muestreo 3 (momento, según antecedentes, de mayor infección por el microsporidio), mediante multiplex PCR.

La amplificación de un fragmento único de 220 pb, tamaño esperado para *N. ceranae*, permitió identificar la presencia de esta especie (Figura 14).

En los controles positivos se observa el amplicón esperado para *N. apis* y *N. ceranae*, mientras que en el control negativo no se observa ninguna banda, validando el ensayo (carril 5).

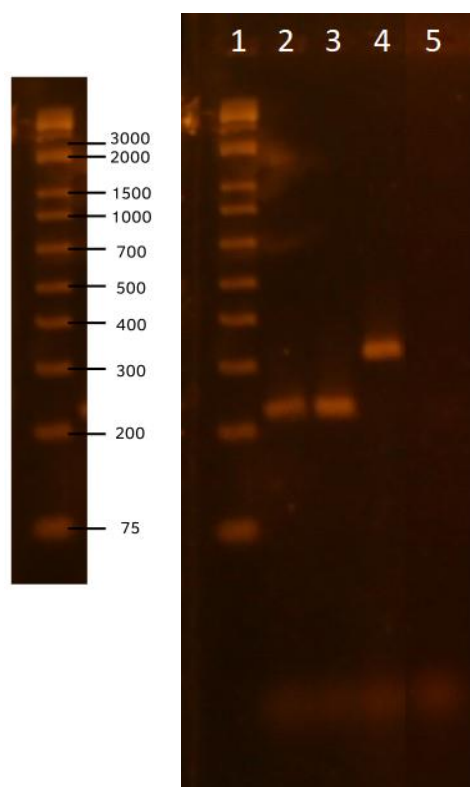


Figura 14. Identificación de la especie de *Nosema* spp. mediante multiplex PCR empleando *primers* específicos para *N. apis* y *N. ceranae*. Carriles: 1: marcador de peso molecular, 2: muestra de ADN producto de PCR, 3: control positivo de *Nosema ceranae*, 4: control positivo de *Nosema apis* y 5: control negativo.

7.6 Estado nutricional

El peso seco tanto de la cabeza como del tórax se utilizó como un parámetro del estado nutricional de las abejas por su relación con el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y la musculatura alar, respectivamente (Crailsheim y Hrassnigg, 1998; Brodschneider *et al.*, 2009).

Al inicio del ensayo (muestreo 1), las abejas de colmenas pertenecientes al grupo control presentaron un peso significativamente mayor de la cabeza que las abejas de colmenas que recibieron polen polifloral, Feedbee y torta casera (Wilcoxon test, p valor = 0,04; p valor = 0,009 y p valor = 0,03, respectivamente) (Figura 15).

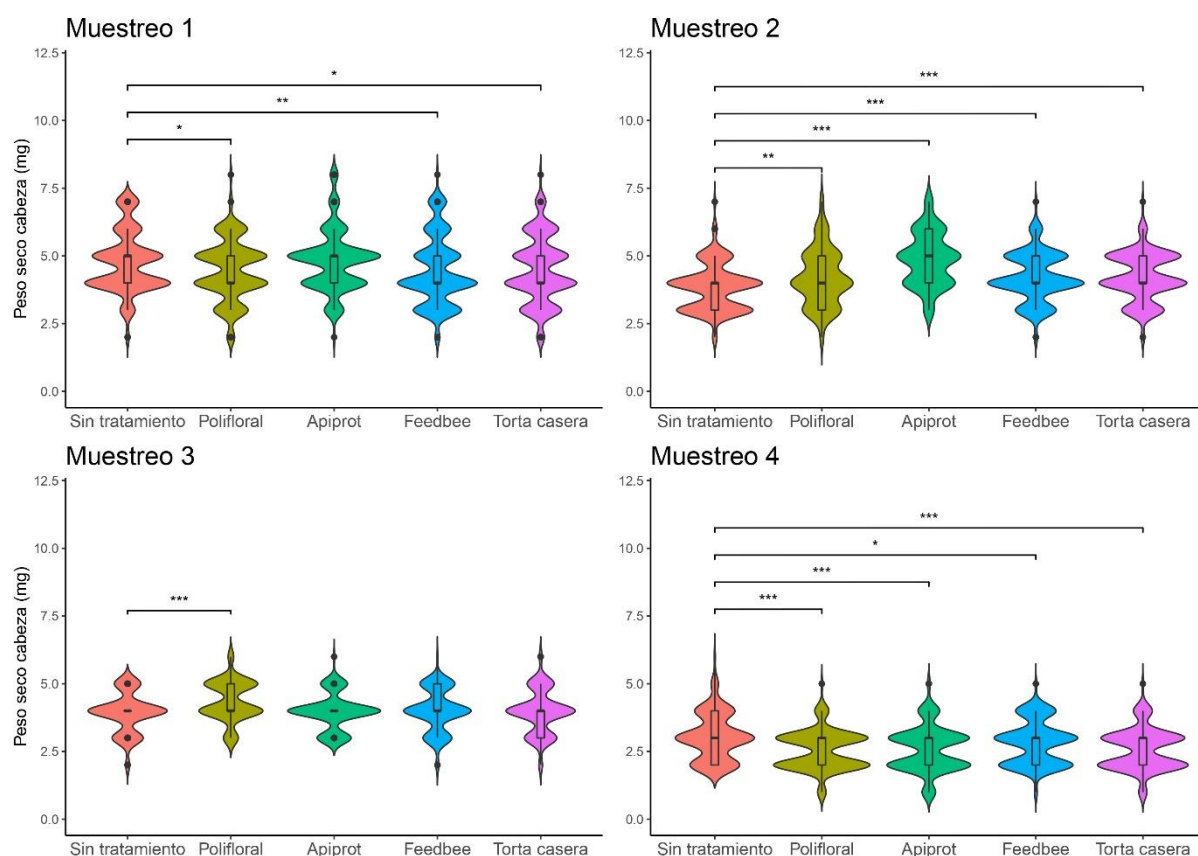


Figura 15. Efecto de la suplementación nutricional en el estado nutricional de las abejas, evaluado a través del peso seco de la cabeza. Se analizaron 30 cabezas por colmena y 5 colmenas por tratamiento, diferenciándose en los grupos: sin tratamiento, polen polifloral, Apiprot, Feedbee y torta de preparación casera. Cada gráfica muestra los valores de peso seco para cada muestreo: muestreo 1, muestreo 2, muestreo 3 y muestreo 4. Las diferencias se indican con una línea horizontal negra: *: p valor $\leq 0,05$; **: p valor $\leq 0,01$; ***: p valor $\leq 0,001$). Los *violin plots* incluyen todas las características presentes en un *boxplot*, como los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75, y la mediana e incorporan un diagrama de densidad de los datos que se encuentra rotado en cada lado del gráfico.

La administración de los tratamientos nutricionales afectó este parámetro. Al inicio de la floración de *E. grandis*, las abejas de colmenas suplementadas con la torta de polen polifloral, Apiprot, Feedbee y la torta de preparación casera presentaron mayores valores que las abejas del grupo control (muestreo 2, Test de Wilcoxon, p valor = 0,002; p valor < 0,001; p valor < 0,001 y p valor < 0,001, respectivamente). Incluso en el caso del polen polifloral, la diferencia se mantuvo hasta el final de la floración (muestreo 3, Test de Wilcoxon, p valor < 0,001) (Figura 15).

Por último, en invierno (muestreo 4), los resultados se invirtieron y las abejas del grupo control presentaron nuevamente mayor peso seco de las cabezas que las abejas de colmenas tratadas con polen polifloral, Apiprot, Feedbee y torta casera (Wilcoxon test, p valor < 0,001; p valor < 0,001; p valor = 0,03 y p valor < 0,001, respectivamente) (Figura 15).

Considerando el peso seco del tórax, al inicio del estudio (muestreo 1) las abejas de los grupos que recibieron los diferentes tratamientos presentaron un peso similar a las abejas del grupo control, excepto por el grupo suplementado con la torta de preparación casera en donde se observó un menor valor respecto al grupo control (Wilcoxon test, p valor = 0,008) (Figura 16).

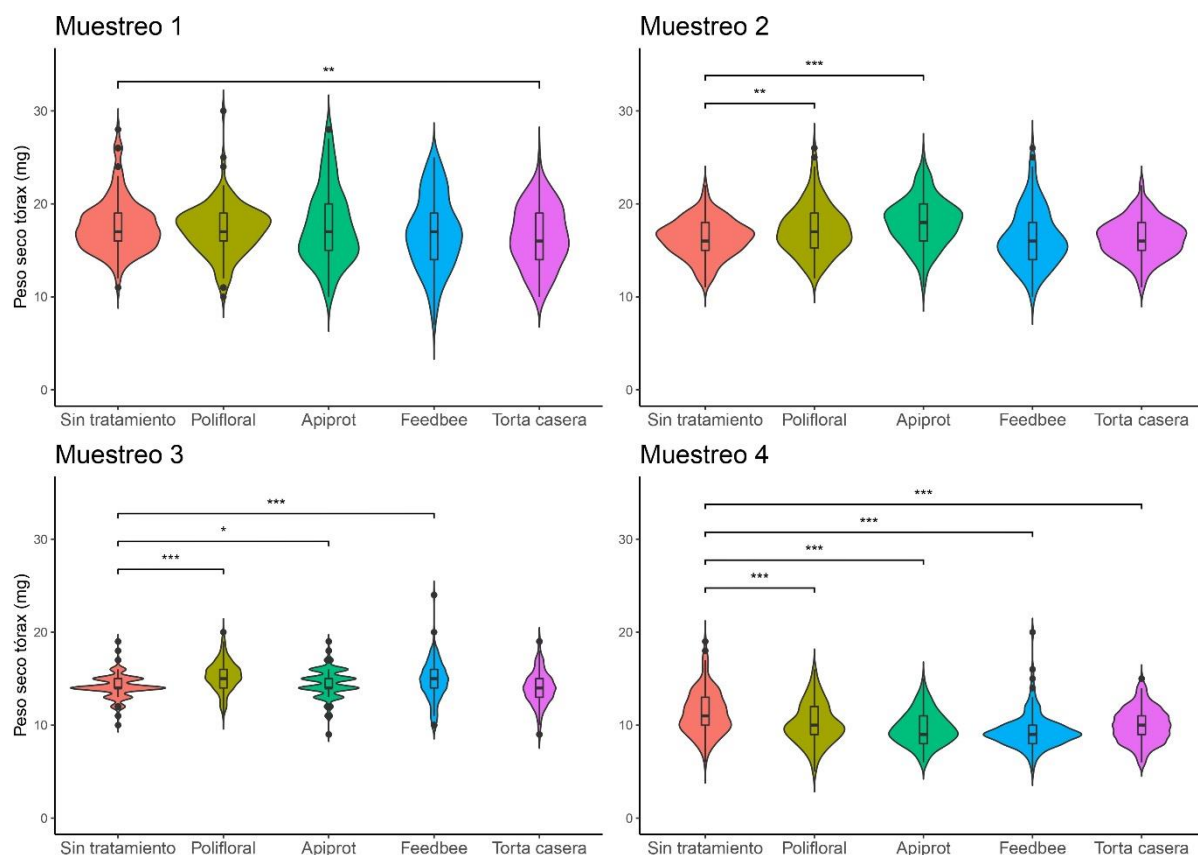


Figura 16. Efecto de la suplementación nutricional en el estado nutricional de las abejas evaluado mediante el peso seco del tórax. Se analizaron 30 abejas por colmena y 5 colmenas por tratamiento, diferenciándose en los grupos: sin tratamiento, polen polifloral, Apiprot, Feedbee y torta de preparación casera. Cada gráfica muestra los valores de peso seco para cada muestreo: muestreo 1, muestreo 2, muestreo 3 y muestreo 4. Las diferencias se indican con una línea horizontal negra: *: p valor $\leq 0,05$; **: p valor $\leq 0,01$; ***: p valor $\leq 0,001$). Los *violin plots* incluyen todas las características presentes en un *boxplot*, como los datos mínimos, máximos, los percentiles 25 y 75, y la mediana e incorporan un diagrama de densidad de los datos que se encuentra rotado en cada lado del gráfico.

La administración de la torta de polen polifloral y Apiprot generaron un aumento del peso seco del tórax durante la floración de *E. grandis* (muestreo 2 y 3) comparado con el grupo control (Test de Wilcoxon, p valor = 0,005; p valor < 0,001; p valor < 0,001; p valor = 0,02, respectivamente). El producto comercial Feedbee también generó un aumento en este

parámetro al finalizar la floración (muestreo 3) respecto el grupo control (Test de Wilcoxon, p valor $< 0,001$) (Figura 16).

Por último, al igual que con el peso seco de la cabeza, en el muestreo 4 los resultados se invirtieron y las abejas del grupo control, presentaron mayor peso seco del tórax que las abejas tratadas con la torta de polen polifloral, Apiprot, Feedbee y la torta de preparación casera (Test de Wilcoxon, p valor $< 0,001$; p valor $< 0,001$; p valor $< 0,001$ y p valor $< 0,001$; respectivamente) (Figura 16).

7.7 Consumo de las tortas

La palatabilidad y el consumo de las tortas por las abejas también es un parámetro a tener en cuenta al diseñar suplementos nutricionales. En este caso, la torta de polen polifloral se consumió completamente (100%) por lo observado en las tres evaluaciones de las aplicaciones. En el caso del producto comercial Feedbee el consumo fue siempre superior al 90%, al igual que con la torta de preparación casera. En este último caso, el consumo disminuyó al 80% en la última evaluación. Finalmente, el producto comercial Apiprot tuvo un bajo consumo en la primera evaluación (aproximadamente el 45%), pero luego subió a un 80% en las dos últimas evaluaciones (ver tabla en el anexo).

8. DISCUSIÓN

Las abejas *A. mellifera* no solo son importantes por la diversidad de plantas silvestres y cultivos comerciales que polinizan, sino también por los diversos productos que derivan de la colmena. Es por esta razón que existe una importante preocupación por las pérdidas de colmenas alrededor del mundo (Potts *et al.*, 2010; Seitz *et al.*, 2015).

Entre las principales causas de la pérdida de colmenas se encuentra la infección por plagas y patógenos, así como el estrés nutricional asociado al aumento de superficie dedicado a los monocultivos y disminución de la diversidad de néctar y polen disponible para las abejas (Potts *et al.*, 2010).

En esta línea, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación con productos proteicos tanto comerciales como de preparación casera, en la fortaleza, salud y productividad de la colmena. En particular, se estudió su efecto en el tamaño poblacional de la colmena, el porcentaje de cría, la producción de miel y la infección por *N. ceranae* (Invernizzi *et al.*, 2009; Anido, 2013; Antúnez *et al.*, 2013).

En este trabajo, la administración de torta de polen polifloral, Apiprot y la torta de preparación casera generó un efecto positivo inmediato durante la floración de *E. grandis*, ya que se observó un aumento en el tamaño poblacional respecto a las colmenas no suplementadas. Por otro lado, la administración de estos productos y Feedbee provocaron un aumento del porcentaje de cría durante la floración en relación al grupo control, sin tratamiento.

La mejora en la fortaleza de la colmena, se vio reflejada una mayor producción de miel, especialmente en las colmenas que fueron tratadas con Apiprot y la torta de preparación casera. Sin embargo, todos los grupos que recibieron tratamientos produjeron en promedio aproximadamente 10 kilos más de miel que el grupo control.

Estos hallazgos confirman los resultados previos de nuestro grupo de investigación, vinculados al efecto del polen polifloral (Branchiccela *et al.*, 2019; Viera, 2021), pero a la vez evidencian que la administración oportuna de ciertos productos comerciales también son estrategias efectivas para mejorar la fortaleza y/o productividad de las colmenas.

Durante el transcurso de la floración (desde el muestreo 1 en febrero al muestreo 3 en mayo) se observó una disminución significativa de la población adulta en todos los grupos analizados (suplementados o no). Esto puede deberse a la dinámica poblacional normal de las colmenas, que se reduce hacia el comienzo del invierno. A la vez, podrían evidenciar la situación de estrés nutricional a la que están sujetas en estas condiciones, como se observó en estudios previos (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2013).

Más allá de esto, la suplementación con Apiprot, Feedbee y torta casera generaron un impacto a largo plazo (agosto), ya que al finalizar el invierno las colmenas suplementadas no

solo tuvieron una mayor población adulta que las colmenas del grupo control, sino que también presentaron un mayor porcentaje de cría. Este efecto no fue observado en aquellas colmenas suplementadas con polen polifloral, coincidiendo con estudios previos (Viera, 2021).

Por un lado, el hecho que la torta polifloral no haya generado efecto a largo plazo puede deberse a que las abejas consumen la torta de polen polifloral apenas se la administramos por ser su alimento natural y, además, al ya estar procesado por otras abejas, tiene una más fácil digestión y menor trabajo asociado. Esta torta de polen se forma a partir del pan de abejas, que consiste en diversos pólenes recolectados del ambiente y almacenados en las celdas, donde se le adiciona miel y microorganismos. Gracias a la acción de diversas enzimas y las condiciones de temperatura y humedad, resulta en un producto más digerible (Gilliam, 1979; Nagai *et al.*, 2004). El consumo inmediato de estas tortas podría hacer que se observen sus efectos a corto plazo. En cambio, el producto comercial Apiprot, Feedbee y la torta casera podrían estar siendo almacenados y utilizados cuando ya no hay polen en el ambiente, lo que explicaría su efecto al finalizar la temporada de invierno.

Por otro lado, el haber observado un aumento en el porcentaje de cría al inicio de la floración (muestreo 2) pero no al final de la misma (muestreo 3) puede explicarse gracias al ciclo biológico natural de las abejas ya que al momento de realizar el muestreo 3 las crías que recibieron los suplementos nutricionales ya emergieron de las celdas, por tanto, vemos las consecuencias de los mismos en la población de abejas adultas y no en el porcentaje de cría. De nuevo, los efectos evidenciados a largo plazo coinciden con la hipótesis de que las abejas almacenan estos suplementos en la colmena para utilizarlos en momentos donde las reservas nutricionales escasean, momento que podría coincidir con el final de la floración que se ha visto que normalmente las colmenas terminan muy debilitadas (Invernizzi *et al.*, 2011; Viera, 2021).

Estos cambios en los parámetros de fortaleza evaluados (población adulta y porcentaje de cría) se vieron directamente reflejados en un aumento en la producción de miel. Entonces, en este trabajo se observó cómo colmenas más fuertes (mayor población de abejas adultas y mayor porcentaje de cría) logran una mayor producción de miel, coincidiendo con estudios en donde se observó que existe una correlación positiva entre estos dos parámetros (Antúnez *et al.*, 2013).

En una segunda instancia evaluamos el impacto de la suplementación nutricional en la salud de las colmenas, en particular en la infección por *Nosema* spp.. Evidencias previas reportan que, en las condiciones generadas en las plantaciones de los eucaliptos, *N. ceranae* tiene una alta tasa de reproducción logrando infectar todas las colmenas que allí se encuentren (Invernizzi *et al.*, 2011; Branchiccela *et al.*, 2019). Esto fue lo que se observó en este trabajo,

donde en todos los grupos analizados, sin importar el suplemento nutricional brindado, se evidenció un aumento en el número de esporas del microsporidio.

Sin embargo, en estudios previos se observó cómo la suplementación con polen polifloral logró amortiguar la condición de estrés nutricional ya que las colmenas tratadas mostraron un menor número de esporas del microsporidio en comparación con las no tratadas (Branchiccela *et al.*, 2019; Viera, 2021), situación no evidenciada en este trabajo. Esta diferencia podría deberse al peso de la torta de polen polifloral administrado ya que en este trabajo se redujo el mismo a la mitad (en este estudio las tortas pesaron 250 gramos, a diferencia de los trabajos previos en donde pesaron 500 gramos). Además, también podría influir la frecuencia de administración, las condiciones climáticas, entre otros factores.

Otra forma de evaluar el efecto de las dietas seleccionadas en el estado nutricional de la colmena fue medir el peso seco tanto de la cabeza como del tórax. En la cabeza se encuentran las glándulas hipofaríngeas, las cuales se encargan de sintetizar la jalea real, producto fundamental para la alimentación de las larvas y de la reina (Wang y Moeller, 1969). Se ha visto que el tamaño de esta glándula es sensible a la cantidad y calidad del polen provisto en la dieta, siendo las glándulas más pequeñas si la dieta de las abejas nodrizas es deficiente, fundamentalmente en proteína (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2010; Corby-Harris y Snyder, 2018). El tórax se relaciona con el desarrollo de la musculatura alar (Brodtschneider *et al.*, 2009) lo cual depende de la nutrición en la etapa larvaria. Por estas razones, ambos son buenos indicadores del estado nutricional de la colmena (Crailsheim y Stolberg, 1989).

Los resultados obtenidos evidencian un aumento significativo en el peso seco de la cabeza en todos los grupos de colmenas suplementadas respecto al grupo control, sin tratamiento, durante la floración de *E. grandis*. Esto podría reflejar un efecto inmediato de los suplementos nutricionales utilizados amortiguando el contexto de estrés nutricional causado por el bajo contenido proteico del polen de esta especie, lo que afecta la glándula hipofaríngea.

Lo mismo fue observado al evaluar el peso seco del tórax.

En relación a los efectos a largo plazo, al final del invierno (muestreo 4) se observó una disminución significativa de los pesos secos respecto al grupo control (sin tratamiento) en los dos indicadores del estado nutricional evaluados. Esto podría deberse al mayor desgaste realizado por las colmenas en relación a la mayor producción de miel generada durante la floración de *E. grandis*. A futuro, podría plantearse la posibilidad de una administración adicional de los suplementos previo al inicio del invierno para evitar esta disminución en el tamaño de las abejas.

Por último, en cuanto al consumo de las tortas aplicadas, la de mayor aceptación fue el polen polifloral el cual fue consumido al 100% en todas las aplicaciones. Esto era esperable ya que

no deja de ser el alimento natural de las abejas. El producto comercial Feedbee y la torta de preparación casera le siguieron en aceptación con valores superiores al 90% en todos los casos, exceptuando la última evaluación de la torta casera en donde se consumió un 80% de la misma. Esto podría deberse a que quizás este tratamiento colmó las necesidades nutricionales de las abejas y no les fue necesario consumirlo en su totalidad ya que más allá de este consumo “medio” se vieron consecuencias positivas que indicarían una amortiguación al estrés nutricional en la forestación. En relación al producto comercial Apiprot, se observaron valores mayores al 80% exceptuando la primera evaluación (18/02/22), correspondiente al consumo de la primera administración (04/02/22), en donde el consumo fue de aproximadamente un 45%. Estos datos nos permiten pensar que quizás es más conveniente aplicar este producto en menores cantidades al comienzo del trabajo y/o en fechas más cercanas a la estadía en la forestación de *E. grandis* ya que en este momento de estrés nutricional el consumo de la torta fue muy superior. Esta modificación en la aplicación del tratamiento con el producto comercial Apiprot le permitiría al apicultor ahorrar no solo económicamente, sino también en tiempo y horas de trabajo, obteniendo resultados seguramente similares.

9. CONCLUSIONES

La administración de polen polifloral como suplemento nutricional en abejas emplazadas en una forestación de *E. grandis*, situación conocida de estrés nutricional, mejoró la fortaleza de la colmena en términos de población de abejas adultas y porcentaje de cría, la productividad medida como kilos de miel producido por las colmenas y, mejoró el estado nutricional.

La administración de una torta preparada en forma casera en INIA, La Estanzuela, permitió una mejora en la fortaleza de la colmena tanto en la población de abejas adultas como en el porcentaje de cría. Esto a su vez, se vio reflejado en una mayor producción de miel. En cuanto al estado nutricional, mejoró en uno de los parámetros evaluados, el peso seco de la cabeza.

En cuanto al producto comercial Apiprot, resultó beneficioso para la fortaleza de la colmena permitiendo un aumento en la población de abejas adultas y en el porcentaje de cría tanto a corto plazo como a largo plazo (muestreo 2 y 4, respectivamente). Estas consecuencias beneficiosas también se vieron reflejadas en un aumento en la producción de miel. El otro producto comercial, Feedbee, permitió un aumento en ambos parámetros de fortaleza (población adulta y porcentaje de cría) a largo plazo (muestreo 4). Además, ambos lograron un aumento en los parámetros del estado nutricional (peso seco de la cabeza y del tórax) durante la floración.

Por último, ningún suplemento nutricional ayudó a disminuir la infección con *N. ceranae*.

10. PERSPECTIVAS

Como ya se ha mencionado anteriormente, este trabajo fue un primer acercamiento a la evaluación de dos productos comerciales que ya están en el mercado desde hace un tiempo y a uno nuevo de preparación casera. Los resultados obtenidos fueron muy alentadores y motivan a profundizar en estos hallazgos.

Primeramente, sería conveniente repetir el ensayo en las mismas condiciones para poder corroborar que las consecuencias benéficas sean producto de los suplementos nutricionales utilizados y no de las características particulares del año en donde se evaluaron (2022). También, se deberían evaluar las consecuencias en otras épocas del año, como puede ser la preparación para la invernada y/o para la primavera, ambos momentos de vital importancia para los apicultores.

Además, en futuros trabajos sería valioso analizar el polen almacenado en las celdas de la colmena posterior a las aplicaciones de los tratamientos para saber con mayor certeza cuál es el destino de los mismos. Si las abejas lo consumen, lo almacenan o lo desechan.

Por último, utilizando herramientas de biología molecular sería interesante analizar, por un lado, genes vinculados a la fisiología de la abeja como la vitelogenina y la hormona juvenil, los cuales se sabe que están asociados con la nutrición y el comportamiento. Y genes relacionados a la inmunidad humoral y celular como el péptido antimicrobiano himenoptecina o la enzima glucosa oxidasa. En trabajos previos del laboratorio se ha visto que la alimentación con polen polifloral genera un aumento de la vitelogenina y la glucosa oxidasa, pero no se vieron efectos de la nutrición en la himenoptecina. Sería conveniente ver qué pasa con estos genes cuando las abejas son alimentadas con los otros suplementos aquí utilizados. Por otro lado, analizar la presencia de otro patógeno frecuente en las abejas *A. mellifera*, el Virus de las Alas Deformes (DWV), el cual se encuentra muy asociado a la presencia del ácaro *V. destructor* y el microsporidio *N. ceranae*. En trabajos previos se ha analizado la influencia de la alimentación con polen monofloral de diferentes orígenes botánicos y polifloral en el nivel de infección, pero aún no se ha estudiado el posible efecto de otros suplementos nutricionales.

11. ANEXO

11.1 Tabla con datos de promedio y desvío estándar de cada ensayo por tratamiento y muestreo.

		Promedio $\pm$ desvío estándar				
		Sin tratamiento	Polen polifloral	Apiprot	Feedbee	Torta casera
M U E S T R E O 1	Población adulta (1)	11,79 $\pm$ 1,3	11,61 $\pm$ 1,15	11,61 $\pm$ 1,01	12,07 $\pm$ 1,27	12,12 $\pm$ 0,99
	Porcentaje de cría (2)	884,26 $\pm$ 115,8	906,43 $\pm$ 93,93	919,44 $\pm$ 144,03	896,07 $\pm$ 68,73	862,06 $\pm$ 145,34
	Porcentaje infección <i>V. destructor</i> (3)	0,1 $\pm$ 0,23	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,47 $\pm$ 0,47
	N° esporas de <i>Nosema</i> spp./abeja	2,06e ⁺⁵ $\pm$ 2,62e ⁺⁵	1,57e ⁺⁵ $\pm$ 2,18e ⁺⁵	1,58e ⁺⁵ $\pm$ 8,45e ⁺⁴	1,75e ⁺⁵ $\pm$ 1,70e ⁺⁵	1,53e ⁺⁵ $\pm$ 5,72e ⁺⁴
	Peso seco cabeza (mg)	4,77 $\pm$ 1,12	4,46 $\pm$ 1,10	4,83 $\pm$ 1,13	4,46 $\pm$ 1,27	4,48 $\pm$ 1,23
	Peso seco tórax (mg)	17,65 $\pm$ 2,89	17,25 $\pm$ 2,73	17,59 $\pm$ 4,04	16,88 $\pm$ 3,93	16,5 $\pm$ 3,29

M U E S T R E O 2	Población adulta (1)	10,82 $\pm$ 1,60	12,38 $\pm$ 0,69	12,13 $\pm$ 1,35	12,41 $\pm$ 2,23	12,75 $\pm$ 1,44
	Porcentaje de cría (2)	395,68 $\pm$ 88,92	505,63 $\pm$ 107,06	492,04 $\pm$ 70,66	533,86 $\pm$ 185,43	503,5 $\pm$ 110,42
	Producción de miel (Kg)	27,32 $\pm$ 10,46	35,02 $\pm$ 10,97	38,45 $\pm$ 9,59	33,14 $\pm$ 13,22	37,88 $\pm$ 11,75
	Porcentaje infección <i>V. destructor</i> (3)	0,08 $\pm$ 0,19	0 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,28	0,21 $\pm$ 0,29	0 $\pm$ 0
	Peso seco cabeza (mg)	3,84 $\pm$ 0,85	4,2 $\pm$ 1,03	4,87 $\pm$ 0,97	4,22 $\pm$ 0,89	4,23 $\pm$ 0,88
	Peso seco tórax (mg)	16,3 $\pm$ 2,05	17,24 $\pm$ 2,65	18,04 $\pm$ 2,57	16,35 $\pm$ 3,1	16,28 $\pm$ 2,08

M U E S T R E O 3	Población adulta (1)	6,26 $\pm$ 1,45	8,25 $\pm$ 1,9	6,64 $\pm$ 2,32	7,07 $\pm$ 2,16	7,74 $\pm$ 2,51
	Porcentaje de cría (2)	202,65 $\pm$ 89,75	239,29 $\pm$ 104,93	244,86 $\pm$ 89,23	215,36 $\pm$ 67,81	217,65 $\pm$ 76,94
	Porcentaje infección <i>V. destructor</i> (3)	0,32 $\pm$ 0,18	0,64 $\pm$ 1,21	0,25 $\pm$ 0,25	0,82 $\pm$ 0,58	1,11 $\pm$ 1,07
	N° esporas de <i>Nosema</i> spp./abeja	4,11e ⁺⁶ $\pm$ 2,04e ⁺⁶	4,29e ⁺⁶ $\pm$ 1,71e ⁺⁶	3,87e ⁺⁶ $\pm$ 3,08e ⁺⁶	3,84e ⁺⁶ $\pm$ 2,55e ⁺⁶	5,23e ⁺⁶ $\pm$ 3,59e ⁺⁶
	Peso seco cabeza (mg)	3,91 $\pm$ 0,72	4,36 $\pm$ 0,73	3,97 $\pm$ 0,65	4,02 $\pm$ 0,76	3,95 $\pm$ 0,79
	Peso seco tórax (mg)	14,15 $\pm$ 1,24	15,33 $\pm$ 1,6	14,47 $\pm$ 1,51	14,74 $\pm$ 2,15	13,97 $\pm$ 1,82

M U E S T R E O 4	Población adulta (1)	2,79 ± 1,25	3,42 ± 2,09	4,32 ± 2,02	4,59 ± 1,97	4,19 ± 1,49
	Porcentaje de cría (2)	360 ± 147,04	394,23 ± 236,11	535,71 ± 197,31	528,18 ± 176,78	509, 53 ± 178,84
	Porcentaje infección <i>V. destructor</i> (3)	0,14 ± 0,23	0,19 ± 0,26	0,07 ± 0,16	0,31 ± 0,18	0 ± 0
	N° esporas de <i>Nosema</i> spp/abeja	2,83e ⁺⁶ ± 1,51e ⁺⁶	3,92e ⁺⁶ ± 3,68e ⁺⁶	2,57e ⁺⁶ ± 1,37e ⁺⁶	2,81e ⁺⁶ ± 1,41e ⁺⁶	3,65e ⁺⁶ ± 1,96e ⁺⁶
	Peso seco cabeza (mg)	3,05 ± 0,85	2,55 ± 0,71	2,59 ± 0,82	2,82 ± 0,79	2,58 ± 0,74
	Peso seco tórax (mg)	11,31 ± 2,37	10,13 ± 2,19	9,68 ± 1,80	9,37 ± 1,88	9,97 ± 1,86

Como unidad de medida se usa promedio el número de “calles” (espacio entre dos cuadros) cubierto por abejas observado por los dos especialistas.

² Como unidad de medida se utilizó la suma de los porcentajes observados de cada cara de cuadro cubierto por cría, en cada colmena.

³ La unidad de medida es el porcentaje de infección, es decir, la proporción de ácaros en función de la cantidad de abejas.

11.2 Estimación del consumo de cada tratamiento

	Porcentaje promedio ± desvío estándar del consumo			
Evaluaciones	Polen polifloral	Apiprot	Feedbee	Torta casera
1era aplicación	100 ± 0	44,9 ± 30,4	96,5 ± 7,6	98 ± 5,4
3era aplicación	100 ± 0	81,6 ± 28,3	100 ± 0	100 ± 0
4ta aplicación	100 ± 0	82,8 ± 32,1	94,3 ± 15,7	82,9 ± 27,8

11.3 Información nutricional de los suplementos utilizados

Suplemento nutricional	Composición
Apiprot	38% proteína
Feedbee	36,4% proteína

Información nutricional	
100% en base seca:	
Grasa	3.9% max
γ-ácido Linoleico, α-ácido Linoleico, ácido Araquidónico, ácido Estearidónico	
Carbohidratos	21.0% max
Fibra 4.0% min, Azúcares 10.0% min	
Vitaminas	4.0% min
A: 2000 IU, D3: 289 IU, E: 4500mg	
B6: 1500mg, B12: 20mg, C: 3000mg	
Minerales	4.0% min
Calcio 5%, Potasio 12%	
Hierro 4%, Zinc 10%	
Proteína	36.4% min
Aminoácidos	
L-Lisina 7.3%, L-Isoleucina 7.0%	
L-Arginina 8.7%, L-Triptófano 6.0%	
L-Metionina 3.0%, L-Leucina 8.3%	
L-Acido glutámico 9.0%, L-Valina 4.0%	
Humedad	4.0% min

Tabla con composición nutricional del producto comercial Feedbee publicada en la web.

12. REFERENCIAS

- 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. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.615830>
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562–565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Aliferis, K. A., Copley, T., & Jabaji, S. (2012). Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology*, 58(10), 1349–1359. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.010>
- American Honey Institute. (1943). *Honey*. Institute.
- Anderson, D. L., & Trueman, J. W. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & Applied Acarology*, 24(3), 165–189. <https://doi.org/10.1023/a:1006456720416>
- Anido, M. (2013). Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay. Tesis de maestría. UDELAR.
- 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.

- 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>
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, M. B., Harriet, J., Campá, J., Invernizzi, C., Martín-Hernández, R., Higes M., & Zunino, P. (2013). Despoblación de colmenas. *Proyecto FPTA-258 Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. INIA Serie FPTA*, (41), 36.
- Antúnez, K. (2015). Apicultura En Uruguay: Producción Y Desafíos. *Latin American Archives of Animal Production* 23 (5). http://ojs.alpa.uy/index.php/ojs_files/article/view/2506.
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., vanEngelsdorp, D., & Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, 48(3), 364–370. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0482-2>
- Anuario de OPYPa 2021*. (n.d.). Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Retrieved November 18, 2022, from <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/anuario-opypa-2021>
- 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>
- Arien, Y., Dag, A., Yona, S., Tietel, Z., Lapidot Cohen, T., & Shafir, S. (2020). Effect of diet lipids and omega-6:3 ratio on honey bee brood development, adult survival and body

- composition. *Journal of Insect Physiology*, 124(104074), 104074.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104074>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 207–225.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Berenbaum, M. R., & Calla, B. (2021). Honey as a functional food for *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, 66(1), 185–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-040320-074933>
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., & Higes, M. (2013). *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*, 44, 25. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-25>
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J., & Gunn, A. (1999). The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(1), 101–106.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4807>
- Bowen-Walker, P. L., & Gunn, A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia experimentalis et applicata*, 101(3), 207–217. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00905.x>
- 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), 10156.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46453-9>
- Branchiccela B., Antúnez K., Invernizzi C., Coll F. (Ed.). (Setiembre 2020). *Revista INIA: Apicultura en montes de Eucalyptus spp* (Número 62).
- Branchiccela B. (2020). Rol de la nutrición de la abeja *Apis mellifera* en la infección con los patógenos de mayor importancia apícola. Tesis de Doctorado. UDELAR.
- Brodschneider, R., Riessberger-Gallé, U., & Crailsheim, K. (2009). Flight performance of artificially reared honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 40(4), 441–449.
<https://doi.org/10.1051/apido/2009006>
- 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>
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., & de Graaf, D. C. (2017). *Nosema neumannii* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology*, 61(Pt A), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.07.002>
- Corby-Harris, V., & Snyder, L. A. (2018). Measuring hypopharyngeal gland acinus size in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 139. <https://doi.org/10.3791/58261>

- Cornman, R. S., Chen, Y. P., Schatz, M. C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J. S., Lipkin, W. I., & Evans, J. D. (2009). Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*, 5(6), e1000466. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000466>
- Crailsheim, K., & Stolberg, E. (1989). Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 35(8), 595–602. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90121-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90121-2)
- Crailsheim, K., & Hrassnigg, N. (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)
- Crane, E. (1990). *Bees and beekeeping: Science, practice and world resources*. Butterworth-Heinemann.
- Day, S., Beyer, R., Mercer, A., & Ogden, S. (1990). The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago, New Zealand. *Journal of apicultural research*, 29(3), 138–146. <https://doi.org/10.1080/00218839.1990.11101210>
- de Groot, A. P. (1953). *Protein and amino acid requirements of the honeybee (Apis mellifera L.)*. W. Junk.
- De Jong, D., De Jong, P. H., & Gonçalves, L. S. (1982). Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of*

<https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100535>

DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., & Huang, M. H. (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 56(9), 1184–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.017>

Delaplane, K. S., van der Steen, J., & Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–12. <https://doi.org/10.3896/ibra/1.52.1.03>

Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., & Ellis, J. D. (2013). Standard methods for *varroa* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–54. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.1.09>

Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L., & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PloS One*, 8(8), e72016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>

Dolezal, A. G., Carrillo-Tripp, J., Judd, T. M., Allen Miller, W., Bonning, B. C., & Toth, A. L. (2019). Interacting stressors matter: diet quality and virus infection in honeybee health. *Royal Society Open Science*, 6(2), 181803. <https://doi.org/10.1098/rsos.181803>

- Doner, L. W. (1977). The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443–456. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280508>
- 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. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 1(3), 227–232.
- Erlar, S., Denner, A., Bobiş, O., Forsgren, E., & Moritz, R. F. A. (2014). Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecology and Evolution*, 4(20), 3960–3967. <https://doi.org/10.1002/ece3.1252>
- Evans, J. D., & Schwarz, R. S. (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19(12), 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.003>
- Fadhilah, A., Gabbar, A., & Bokhari, A. A. (2022). Microsporidium.
- FAO. (2014). Principios y avances sobre polinización. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3547s.pdf>
- Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R., & del Aguila, C. (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6886–6889. <https://doi.org/10.1128/AEM.01025-09>
- 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>

- 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. [https://doi.org/10.1016/s0932-4739\(96\)80059-9](https://doi.org/10.1016/s0932-4739(96)80059-9)
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster, T. C., & Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–28. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.1.14>
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie*, 10(1), 43–53. <https://doi.org/10.1051/apido:19790106>
- Haber, A. I., Steinhauer, N. A., & vanEngelsdorp, D. (2019). Use of chemical and nonchemical methods for the control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and associated winter colony losses in U.S. beekeeping operations. *Journal of Economic Entomology*, 112(4), 1509–1525. <https://doi.org/10.1093/jee/toz088>
- Hepburn, H. R. (1986). *Honeybees and Wax*. Springer Berlin Heidelberg.
- Herbert, E. W., Jr, Shimanuki, H., & Caron, D. (1977). Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie*, 8(2), 141–146. <https://doi.org/10.1051/apido:19770204>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>
- 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., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, P. G., & Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse: Natural *Nosema ceranae* infection. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>
- 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.x>
- Hung, K.-L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., & Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings. Biological Sciences*, 285(1870), 20172140. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., & Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in

- Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 150–153.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.006>
- 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>
- 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.
<https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/176>
- Jeddar, A., Kharsany, A., Ramsaroop, U. G., Bhamjee, A., Haffejee, I. E., & Moosa, A. (1985).
 The antibacterial action of honey. An in vitro study. *South African Medical*
Journal, 67(7), 257–258.
- Keller, I., Fluri, P., & Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees:
 part 1. *Bee World*, 86(1), 3–10. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2005.11099641>
- Kerkut GA., G. L. I. (1985). Comprehensive insect physiology, biochemistry and
 pharmacology. *Insect Biochemistry*, 15(5), i–xiv. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(85\)90131-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(85)90131-3)
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F.,
 Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., & Paxton, R. J.
 (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent

- pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014>
- 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. Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kleinschmidt, G. J., & Kondos, A. C. (1976). Influence of crude protein levels on colony production. *Australasian Beekeeper*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302515700>
- Kralj, J., & Fuchs, S. (2006). Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, 37(5), 577–587. <https://doi.org/10.1051/apido:2006040>
- Kralj, J., & Fuchs, S. (2010). *Nosema* spp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*, 41(1), 21–28. <https://doi.org/10.1051/apido/2009046>
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(6), 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
- Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82(2), 60–75. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2001.11099504>
- Marcucci, M. C. (1994). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83–99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>

- 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>
- Mauseth, J. D. (2019). *Botany: An introduction to plant biology* (7a ed.). Jones and Bartlett.
- 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 of *Nosema ceranae* in Honey Bees (*Apis mellifera*) Colonies in *Eucalyptus grandis* Plantations. *Agrociencia Uruguay*, 17(1). <https://doi.org/10.31285/agro.17.522>
- MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 2020. Datos del Sistema Nacional de Trazabilidad de productos apícolas. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/sinatpa-informe-datos-del-registro-nacional-propietarios-colmenas>
- Molan, P. C. (1992). The Antibacterial Activity of Honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1), 5–28. <https://doi.org/10.1080/0005772x.1992.11099109>
- Nader, R. A., Mackieh, R., Wehbe, R., El Obeid, D., Sabatier, J. M., & Fajloun, Z. (2021). Beehive products as antibacterial agents: A review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(6), 717. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060717>

- Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T., & Inoue, R. (2004). Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Die Nahrung*, 48(3), 226–229. <https://doi.org/10.1002/food.200300421>
- Nates Parra, G. (2005). *Abejas silvestres y polinización*. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/5728>
- Naug, D. (2009). Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, 142(10), 2369–2372. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.007>
- 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(1), 417–432. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023731>
- 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. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190125>
- Olate-Olave, V. R., Verde, M., Vallejos, L., Perez Raymonda, L., Cortese, M. C., & Doorn, M. (2021). Bee health and productivity in *Apis mellifera*, a consequence of multiple factors. *Veterinary Sciences*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/vetsci8050076>
- Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8), 312–315. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(99\)01613-4](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(99)01613-4)

- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* (Copenhagen, Denmark), 120(3), 321–326.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Ollerton, J. (2021). *Pollinators and pollination: Nature and society*. Pelagic Publishing.
<https://books.google.at/books?id=0WcKEAAAQBAJ>
- 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. <https://doi.org/10.1051/apido:2007037>
- Pernal, S. F., & Currie, R. W. (2000). Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31(3), 387–409.
<https://doi.org/10.1051/apido:2000130>
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Requier, F., Antúnez, K., Morales, C. L., Aldea Sánchez, P., Castilhos, D., Garrido, P. M., Giacobino, A., Reynaldi, F. J., Rosso Londoño, J. M., Santos, E., & Garibaldi, L. A. (2018).

Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 657–662.

<https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494919>

Rodríguez-García, C., Evans, J. D., Li, W., Branchiccela, B., Li, J. H., Heerman, M. C., Banmeke, O., Zhao, Y., Hamilton, M., Higes, M., Martín-Hernández, R., & Chen, Y. P. (2018). Nosemosis control in European honey bees, *Apis mellifera*, by silencing the gene encoding *Nosema ceranae* polar tube protein 3. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Pt 19), jeb184606. <https://doi.org/10.1242/jeb.184606>

Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 Suppl 1, S96-119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

Rubanov, A., Russell, K. A., Rothman, J. A., Nieh, J. C., & McFrederick, Q. S. (2019). Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure. *Scientific Reports*, 9(1), 3820. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40347-6>

Salamanca Grosso, G., Osorio Tangarife, M. P., & Rodríguez Arias, N. (2012). Presencia e incidencia forética de *Varroa destructor* A. (Mesostigma: Varroidae) en colonias de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), en Colombia. *Zootecnia tropical*, 30(2), 183–195. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-72692012000200007&script=sci_arttext

Santos, E., Invernizzi, C., García, E., Cabrera, C., Di Landro, R., Saadoun, A., & Daners, G. (2009).

Contenido de proteína cruda del polen de las principales especies botánicas utilizadas por las abejas melíferas en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 13(2), 9–13.

http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-

15482009000200002

Santos E., Mendoza Y., Díaz R., Harriet J., Campa J. (2009). Valor económico de la polinización

realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación. *Jornada de Apicultura*, 568, 30.

Schmidt, J. O. (1984). Feeding preferences of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae):

Individual versus mixed pollen species. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 57(2), 323–327. <http://www.jstor.org/stable/25084515>

Schmidt, J. O., Thoenes, S. C., & Levin, M. D. (1987). Survival of honey bees, *Apis mellifera*

(Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *Annals of the Entomological Society of America*, 80(2), 176–183. <https://doi.org/10.1093/aesa/80.2.176>

Schulz, D. J., Huang, Z.-Y., & Robinson, G. E. (1998). Effects of colony food shortage on

behavioral development in honey bees. *Behavioral ecology and sociobiology*, 42(5), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s002650050442>

Seitz, N., Traynor, K. S., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Ellis, J. D., Rose, R., Tarpy,

D. R., Sagili, R. R., Caron, D. M., Delaplane, K. S., Rangel, J., Lee, K., Baylis, K., Wilkes, J. T., Skinner, J. A., Pettis, J. S., & vanEngelsdorp, D. (2015). A national survey of managed

- honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 292–304. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1153294>
- 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. <https://doi.org/10.1051/apido/2010016>
- Somerville, D. C., & Nicol, H. I. (2006). Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), 141. <https://doi.org/10.1071/ea03188>
- Somerville, D. C. Nutritional Value of Bee Collected Pollen. *Rural Ind. Res. Dev, Corp.* 1–166 (2001).
- Southwick, E. E., & Southwick, L., Jr. (1992). Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *Journal of Economic Entomology*, 85(3), 621–633. <https://doi.org/10.1093/jee/85.3.621>
- Standifer, L. N., McCaughey, W. F., Todd, F. E., & Kemmerer, A. R. (1960). Relative availability of various proteins to the honey Bee1. *Annals of the Entomological Society of America*, 53(5), 618–625. <https://doi.org/10.1093/aesa/53.5.618>
- Steinhauer, N. A., Rennich, K., Wilson, M. E., Caron, D. M., Lengerich, E. J., Pettis, J. S., Rose, R., Skinner, J. A., Tarpy, D. R., Wilkes, J. T., vanEngelsdorp, D., & for the Bee Informed Partnership. (2014). A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual

- colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of apicultural research*, 53(1), 1–18. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.53.1.01>
- Toth, A. L., Kantarovich, S., Meisel, A. F., & Robinson, G. E. (2005). Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *The Journal of Experimental Biology*, 208(Pt 24), 4641–4649. <https://doi.org/10.1242/jeb.01956>
- Toth, A. L., & Robinson, G. E. (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, 69(2), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.03.017>
- Urbietta-Magro, A., Higes, M., Meana, A., Gómez-Moracho, T., Rodríguez-García, C., Barrios, L., & Martín-Hernández, R. (2019). The levels of natural *Nosema* spp. infection in *Apis mellifera iberiensis* brood stages. *International Journal for Parasitology*, 49(8), 657–667. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.04.002>
- Viera, N. (2021). Administración de polen polifloral como estrategia para mejorar la salud y productividad de colonias de abejas melíferas. Tesis de Maestría. UDELAR.
- Vit, P. (2005). Productos de la colmena secretados por las abejas: Cera de abejas, jalea real y veneno de abejas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*, 36(1), 35–42. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-04772005000100006&script=sci_arttext
- Wang, D.-I., & Moeller, F. E. (1969). Histological comparisons of the development of hypopharyngeal glands in healthy and *Nosema*-infected worker honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(2), 135–142. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(69\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90098-6)

Weiss, L. M., & Becnel, J. J. (2014). *Microsporidia: Pathogens of opportunity* (L. M. Weiss & J. J. Becnel, Eds.). John Wiley & Sons.

Zander, E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Munchener Bienenzeitung 31, 196–204.