

Propóleos como estrategia para mejorar la salud de las abejas melíferas



(<http://trogtrogbee.blogspot.com/>)

Tesis de Maestría PEDECIBA, Biología.

Lic. Guillermo Añón

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

2022

Propóleos como estrategia para mejorar la salud de las abejas

Lic. Guillermo Añón

Tesis de Maestría, PEDECIBA

Área Biología

Sub-área Microbiología

Orientador: Dra. Karina Antúnez

Co-orientador: Dra. Daniela Arredondo

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal:

Dr. Federico Battistoni

Dra. Silvana Alborés

Dra. Jessica Martínez

Este trabajo fue financiado por ANII-Fondo María Viñas

(FMV_1_2017_1_135942) ANII-Beca Posgrado Nacional.

Índice:

Agradecimientos	5
Resumen	6
Introducción	7
Historia de la apicultura	7
Apicultura en Uruguay	9
Origen del Propóleos	10
Importancia de las abejas en la polinización	12
Despoblación de colmenas	13
Plagas y patógenos que afectan a las abejas melíferas	13
- <i>Nosema ceranae</i>	14
- <i>Varroa destructor</i>	17
- Virus	20
- Virus de las Alas Deformes (DWV)	23
Inmunidad de las abejas melíferas	24
Uso del propóleos como estrategia para mejorar la salud de las abejas melíferas	26
Hipótesis	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
Capítulo 1: Efecto del EEP sobre la salud de las abejas melíferas a nivel individual.	29
Materiales y Métodos	30
- Preparación del EEP	30
- Obtención de esporas de <i>N. ceranae</i>	30
- Evaluación de la toxicidad del EEP	30
- Efecto de la administración de EEP en abejas sanas	31
- Efecto de la administración de EEP en abejas sintomáticas	32
- Análisis del nivel de infección por <i>Nosema ceranae</i>	32
- Extracción y retrotranscripción de ARN	33
- qPCR	33
- Análisis estadísticos	34
Resultados	35
Toxicidad del EEP en abejas melíferas	35
Efecto del EEP en abejas melíferas sanas infectadas experimentalmente con <i>N. ceranae</i>	36
Cuantificación del DWV	37
Expresión de genes vinculados a la inmunidad	38

Efecto del extracto etanólico de propóleos en abejas melíferas infestadas naturalmente con <i>V. destructor</i> y DWV, e inoculadas con <i>N. ceranae</i>	41
Cuantificación de DWV	42
Discusión	47
Capítulo 2: Efecto de la administración del EEP en colmenas de producción	51
Materiales y Métodos	52
- Ensayo de campo:	52
- Fortaleza de la colmena	53
- Cuantificación de <i>Varroa destructor</i> :	53
- Cuantificación de <i>Nosema spp</i> :	53
- Análisis estadístico	54
Resultados	55
Fortaleza de la colmena	55
Estado sanitario de las colmenas	57
Conclusiones generales	61
Perspectivas	62
Referencias	63

Agradecimientos

En el ámbito académico, al Laboratorio de Micro, que todos sus integrantes que transitaron por este camino me acompañaron en mi desarrollo como profesional. Especialmente a Karina y Daniela que me abrieron las puertas en sus líneas de investigación y estuvieron presentes en el proceso.

Al West, que todos los días se armaban debates, tanto de ciencia como noticias, entre otros temas y por las salidas after-lab.

A mi familia y Paula, que bancaron siempre y ayudaron a que logre todo lo que me propongo.

A mis amigos, que siempre estamos todos en la vuelta.

Y no podía faltar Thor y Olivia, que siempre saben hacer lo suyo.

Resumen

Las abejas melíferas son importantes insectos polinizadores que promueven la reproducción de plantas silvestres y cultivos comerciales. En los últimos años se han reportado pérdidas de colmenas alrededor del mundo, siendo la presencia de múltiples plagas y patógenos una de las principales causas. Entre los patógenos de mayor importancia apícola se encuentran la bacteria *Paenibacillus larvae*, el microsporidio *Nosema ceranae*, el ácaro *Varroa destructor* y diferentes virus ARN. En muchos casos, es necesaria la aplicación de tratamientos que permitan prevenir o tratar la infección por estos patógenos. Sin embargo, la aplicación de sustancias químicas puede provocar el desbalance en la homeostasis entérica de los individuos, afectando también su metabolismo y la respuesta inmune, favoreciendo la aparición de organismos resistentes y la generación de residuos que permanecen en la miel afectando su calidad para el consumo. Esto hace necesaria la búsqueda de estrategias alternativas para prevenir o controlar estos patógenos. El extracto etanólico de propóleos (EEP) se ha utilizado empíricamente en la apicultura para la prevención de enfermedades de las abejas durante años. Sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales han sido ampliamente documentadas. El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de EEP en la fisiología, inmunidad y susceptibilidad a patógenos de abejas adultas a nivel individual, así como en la fortaleza y salud de colmenas de producción. En el primer capítulo de esta tesis se realizaron ensayos de cría de abejas en laboratorio, con el fin de evaluar el efecto del EEP en diferentes dosis y frecuencias de aplicación, en la sobrevivencia e inmunidad de las abejas y en la infección por el microsporidio *N. ceranae*. La administración del EEP una vez por semana fue capaz de reducir el número de esporas de *N. ceranae* por abeja, además de generar cambios en la expresión de genes vinculados a la inmunidad. En el segundo capítulo de esta tesis se estudió el efecto del EEP en la fortaleza y salud a nivel colonial, en colmenas de producción. En este ensayo la administración del EEP no modificó la fortaleza de la colmena ni el nivel de infección de los patógenos estudiados. A pesar de esto, dado que los resultados obtenidos a nivel de laboratorio resultaron auspiciosos, futuros estudios deberían abordar diferentes formas y frecuencias de aplicación a nivel de campo.

Introducción

Historia de la apicultura

Las abejas melíferas son importantes insectos polinizadores de plantas silvestres y cultivadas, contribuyendo directamente a la obtención de alimentos y a la reproducción de las plantas. Además, producen diferentes productos que el hombre utiliza con diversos fines, como la miel, polen, propóleos, jalea real y apitoxina.

Los primeros registros sobre la domesticación de las abejas melíferas se remontan a los pueblos egipcios, donde se han encontrado jeroglíficos del año 2400 aC con dibujos de abejas e incluso de colmenas horizontales (Figura 1). La miel era utilizada como endulzante natural, en la preparación de bebidas alcohólicas, como ofrenda a los dioses en rituales sagrados y en el proceso de embalsamamiento de la realeza (Crane, 1999).

El propóleos también era utilizado por los antiguos egipcios, romanos y griegos por sus valiosas propiedades terapéuticas. Al día de hoy, se sigue utilizando como remedio casero popular en muchos países del mundo, así como componente alimentario, cosmético y preparaciones medicinales de venta libre (De Groot, 2013; Sforcin & Bankova, 2011).

En su origen, la apicultura consistía en sacar colmenas de abejas de su hábitat natural y transportarlas a colmenas construidas con diferentes materiales, como barro, troncos de árboles ahuecados, paja o mimbre. Allí cada vez que se extraía la miel, en general se mataban las abejas y se perdía la colmena (Crane, 1999).

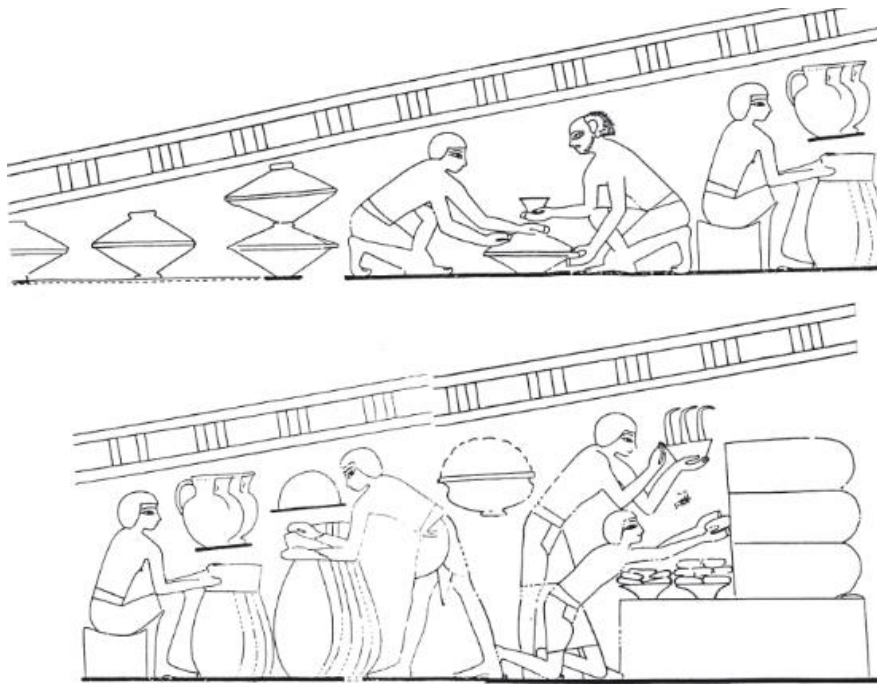


Figura 1.- Pintura mural en la tumba de Rekhmire, Egipto, 1450 a. C. La figura de abajo es la continuación de la de arriba. En la misma se observa cómo se cosechan los productos de la colmena (Crane, 1999).

Con la creación de la colmena móvil estándar en 1851 por Lorenzo Langstroth, la apicultura se pudo desarrollar de manera más armoniosa. Langstroth se dedicó al estudio del "espacio abeja", la distancia que existe entre los cuadros que contienen los panales (poco menos de 9 mm), que permite que dos abejas caminen espalda con espalda (Langstroth, 1857). Este concepto permanece vigente hasta el día de hoy (Crane, 1999) y se conforma de cajones de madera (alza y media alza), piso y techo, lo que permite a los apicultores trabajar con más facilidad. Posteriormente se creó la primera prensa para estampar cera en los cuadros móviles y los extractores mecánicos de miel utilizados para la cosecha.

Apicultura en Uruguay

El sector apícola en Uruguay cuenta con cerca de 2500 productores que poseen 565.600 colmenas (RNPC-SINATPA-MGAP- 2021) (Figura 2). La miel es el segundo producto de granja más exportado, siendo comercializada más del 90% de la producción. El volumen de exportación de miel varía de acuerdo al año, pero ronda entre las 5000 y 15000 toneladas de acuerdo al Sistema Nacional de Trazabilidad de la Miel y los Productos Apícolas (MGAP 2021; Observador 2021) (Figura 3).

Además de miel, nuestro país exporta en menor medida otros productos de la colmena, siendo el propóleo el segundo producto apícola más exportado (Anuario de OPYPA-MGAP 2021).

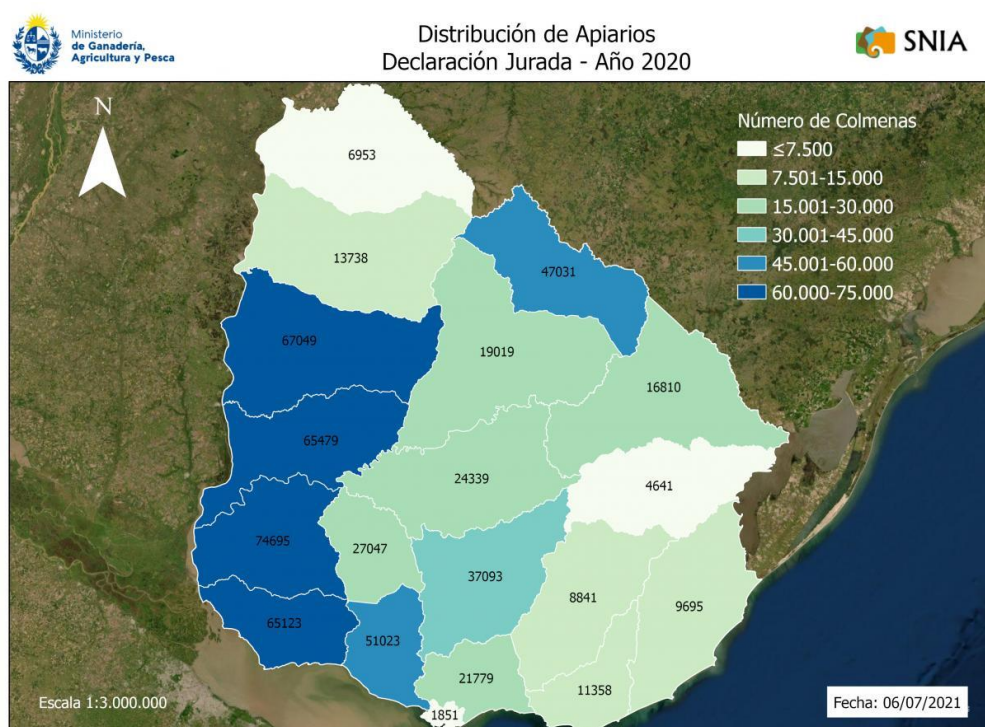


Figura 2.- Distribución de las colmenas a lo largo del país. (Sistema Nacional de trazabilidad de productos apícolas SINATPA, Boletín de comunicación Nro. 5 2021)

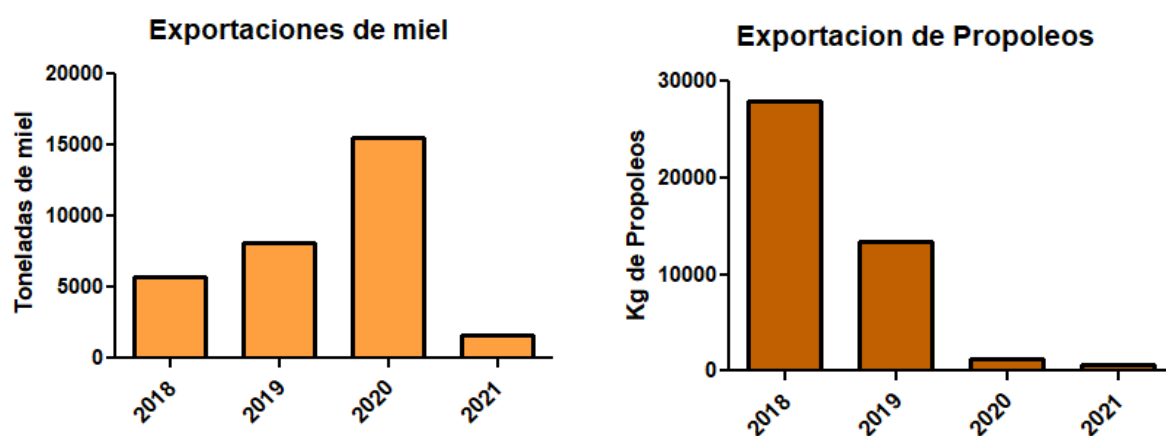


Figura 3.- Cantidad de miel y propóleos exportada en Uruguay (en toneladas y kilogramos respectivamente) en los últimos 3 años. Datos obtenidos del informe (Anuario de OPYPA-MGAP 2021).

Origen del Propóleos

El término “propóleos” tiene origen griego, donde: “pro” significa “frente a / para” y “polis” significa “ciudad”, es decir, frente (o para defensa) de la ciudad. El propóleos es producido por las abejas a partir de la recolección de resinas de plantas y árboles. Las plantas secretan estas resinas aromáticas para defenderse de predadores y patógenos (Langenheim, 2003), por lo que generalmente tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y/o antivirales (Marcucci, 1994; Santos *et al.*, 2003; Simone y Spivak, 2010). Están compuestas principalmente por polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres), aldehídos fenólicos y cetonas. La composición química del propóleos varía según las especies de plantas que le dieron origen (Bankova *et al.*, 2019).

Las abejas pueden extraer las resinas fragmentando las hojas con sus mandíbulas o recogiendo directamente de la superficie de la planta (Meyer y Ulrich, 1956; Teixeira *et al.*, 2005). Se ha observado que, según la especie de abeja, pueden recoger más o menos cantidad de resinas. Por ejemplo, las abejas africanas (*Apis mellifera scutellata* y *A. mellifera caucasica*) recogen más cantidad que las abejas asiáticas *Apis cerana* (Page *et al.*, 1995).

En cada colmena, el número de abejas que se dedica a esta actividad es bajo (menor al 1%). Esta es una tarea difícil y más demandante en comparación con la recolección de polen y néctar. Debido a la viscosidad de las resinas, las abejas deben pasarlo de sus

mandíbulas a las patas traseras (mismo lugar en el que depositan el polen) antes de volver a la colmena. Cuando la abeja llega a la colmena, otras abejas deben ayudar a quitarle la resina de las patas, lo que puede llevar hasta 30 minutos (Nakamura y Seeley, 2006). Luego de esta maniobra, las abejas llevan la resina en sus mandíbulas al sitio de la colmena en el que serán depositados, donde se mezcla con cera formando el propóleos (Figura 4).

Las abejas silvestres forman colmenas en las cavidades de los árboles y cubren totalmente con propóleos las paredes internas (Seeley y Morse, 1976). Está cubierta de propóleos actúa como barrera impermeable a la humedad, barrera física para los invasores (sellando huecos o grietas) y como capa antimicrobiana (Seeley y Morse, 1976).

En colmenas de producción localizadas en cajones de madera, las abejas no generan esta cubierta de propóleos, sin embargo, rellenan los huecos o grietas de la madera con esta sustancia (Borba *et al.*, 2015; Ghisalberti, 1979; Simone y Spivak, 2010).



Figura 4.- Foto donde se puede observar una abeja cargando propóleos en sus patas traseras y el propóleos depositado en la colmena. Imagen tomada de Simone-Finstrom & Spivak (2010).

Importancia de las abejas en la polinización

La polinización es el transporte del gameto masculino (polen) desde los estambres (órgano reproductor masculino de las flores) hasta el órgano reproductor femenino (pistilo) (Abrol, 2011). Este proceso hace posible la fecundación de las plantas y por lo tanto la producción de frutos y semillas. La polinización puede ser mediada tanto por vectores abióticos (agua o viento) como bióticos (animales). La gran mayoría de las angiospermas (plantas con flores) dependen de los animales para su fecundación, y dentro de estos se destaca la polinización mediada por insectos (Potts *et al.*, 2016).

El 75% de los cultivos de frutas, verduras o semillas necesarias para la alimentación humana dependen o se ven beneficiadas por los polinizadores, ya sea en el tamaño de fruto, cantidad y calidad (Potts *et al* 2016; Klein *et al.*, 2007). El volumen de producción agrícola que depende de los polinizadores aumentó un 300% en los últimos 50 años, siendo dos ejemplos de esto el cacao y el café (FAO, 2018).

Muchas especies de insectos visitan las flores y colaboran en la polinización (avispa, polillas, mariposas, escarabajos y mosquitos), pero las abejas melíferas se encuentran entre las más eficaces. El tamaño de su cuerpo y el largo de probóscide (aparato por el cual succionan el néctar) les ayuda a pecorear una gran variedad de flores. En su búsqueda de nutrientes (proteínas, lípidos, minerales y vitaminas) las abejas suelen recorrer largas distancias y visitar periódicamente las flores para recolectar néctar y polen (Abrol, 2011).

En Uruguay se ha observado que la polinización mediada por abejas favorece la producción de manzanas, zapallitos de tronco, melones, girasol, tomates, pera, durazno, membrillo, entre otros productos de la granja, produciendo frutos de mayor tamaño y mejor calidad (Santos, 2014; Santos *et al.*, 2019). El valor económico de esta actividad se estimó en 1,6 billones de pesos uruguayos.

Despoblación de colmenas

En los últimos años se han observado pérdidas de colmenas de abejas melíferas en muchos países del mundo. Los reportes de estas pérdidas fueron observados inicialmente en países del hemisferio Norte, entre ellos Estados Unidos y varios países de Europa (Neumann y Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010). En algunos casos estas pérdidas se asociaron al síndrome “*Colony Collapse Disorder*” (CCD), caracterizado por el abandono de la cría y reservas de miel y polen, la falta de abejas muertas dentro o alrededor de la colmena y la invasión retardada de plagas (Oldroyd, 2007).

Al día de hoy, el problema de la pérdida y despoblación de colmenas está expandido alrededor del mundo (Hristov *et al.*, 2020; Requier *et al.*, 2018). Entre las principales causas se encuentran la presencia de múltiples plagas y patógenos, la intoxicación con pesticidas y la desnutrición vinculada al incremento de monocultivos (Goulson *et al.*, 2015).

Plagas y patógenos que afectan a las abejas melíferas

El manejo y la comercialización de las abejas melíferas ha favorecido la propagación de diversas plagas y patógenos alrededor del mundo (Moritz *et al.*, 2016). Entre ellos, se encuentran la bacteria *Paenibacillus larvae*, el microsporidio *Nosema ceranae*, el ácaro *Varroa destructor* y diferentes virus ARN. Estos patógenos se encuentran presentes y/o ampliamente distribuidos en nuestro país (Anido *et al.*, 2015; Antúnez *et al.*, 2005, 2006; Invernizzi *et al.*, 2009).

- *Nosema ceranae*

Los microsporidios son hongos parásitos unicelulares e intracelulares obligados. Tienen la capacidad de formar esporas, estructuras de resistencia y única forma infectiva, que les permite sobrevivir fuera de las células. Las esporas pueden presentar un tamaño de entre 1 μm y hasta 40 μm y presentan distintas formas siendo éstas esféricas, en forma de vara, de media luna, aunque la mayoría son ovoides (Chen y Huang, 2010; Huang *et al.*, 2004; Keeling y Fast, 2002).

Se han reportado al momento tres microsporidios que afectan a las abejas melíferas, *Nosema apis* y *Nosema ceranae* son los más conocidos y estudiados (Fries, 2011; Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006). Recientemente se describió en Uganda una tercera especie clasificada como *Nosema neumannii*. La presencia de esta nueva especie también fue reportada en Japón. Hasta el momento no se ha encontrado asociación de la infección por *N. neumannii* con síntomas clínicos particulares (Chemurot *et al.*, 2017; Takashima *et al.*, 2021).

Nosema apis fue reportado como patógeno de *A. mellifera* en 1909 (Fries *et al.*, 2006), mientras que *N. ceranae*, se reportó como patógeno de la abeja asiática *Apis cerana* en 1995 (Fries *et al.*, 1996). Diez años después, se reportaron las primeras infecciones naturales de *N. ceranae* en *A. mellifera* en España y Taiwán (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007). Actualmente *Nosema ceranae* se encuentra distribuido a nivel mundial (Paxton *et al.*, 2007) y es capaz de infectar especies de *Bombus* como *B. atratus* y *B. bellicosus* (Arbulo *et al.*, 2015; Tokarev *et al.*, 2020).

N. apis y *N. ceranae* llegan a las abejas a través de la ingestión de esporas, durante las actividades de limpieza de la colmena o por trofalaxis. Además de esta transmisión horizontal, recientemente se ha demostrado que este patógeno puede ser transmitido en el aire y ser depositado en diversas superficies en los ambientes naturales (incluidas las flores) lo que incrementa el riesgo de infección de las abejas (Graystock *et al.*, 2015; Sulborska *et al.*, 2019). Por último, *N. ceranae* también puede ser transmitido por los zánganos, durante la fecundación de la reina (Roberts *et al.*, 2015).

Las esporas germinan en el lumen del intestino medio, infectando y reproduciéndose dentro de las células del ventrículo, completando su ciclo de vida en 3 días (Fries, 2010; Meana, *et al.*, 2010). El mecanismo de infección se basa en la inyección mecánica de un

filamento polar que sobresale de la espora germinante (Figura 5). El filamento penetra la membrana de la célula del ventrículo y el esporoplasma (el parásito infectivo) es inyectado en el citoplasma de la célula hospedera. Inmediatamente después el parásito inicia la replicación y luego la producción de esporas (Fries *et al.*, 1996; Larsson, 1988). La infección de *Nosema spp.* afecta la función digestiva generando problemas de desnutrición, el pecoreo prematuro de las abejas y una reducción en la longevidad de las mismas (Keeling y Fast, 2002; Meana *et al.*, 2010).

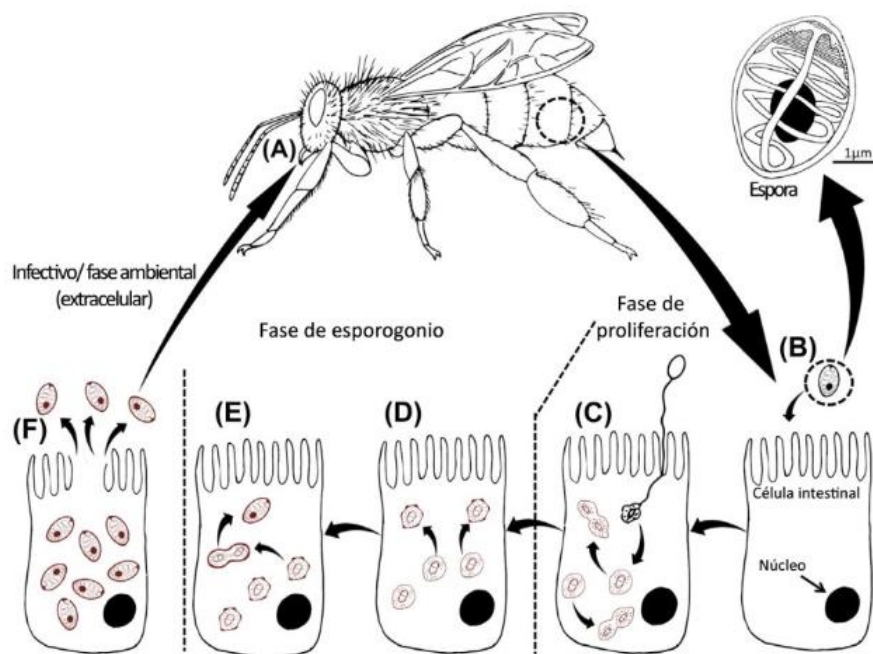


Figura 5.- Ciclo de reproducción de *Nosema* spp. (modificado de Araújo y Hughes, 2016) . La espora es ingerida (A) y en el intestino (B), se da la reversión del filamento polar el cual es inyectado en células intestinales y el esporoplasma ingresa a las células (C), allí comienza la etapa de multiplicación (D y E). Las nuevas esporas son liberadas por lisis celular y pueden re infectar células vecinas o ser eliminadas con las heces generando de esta forma una fuente de contaminación (F).

En nuestro país el agente causal de la nosemosis es principalmente *N. ceranae*, que se encuentra presente al menos desde 1990 (Invernizzi *et al.*, 2009). Se encuentra ampliamente distribuido en nuestro territorio, especialmente en los departamentos con grandes plantaciones de *Eucalyptus* (Figura 6) (Anido *et al.*, 2015).

Una práctica que los apicultores suelen realizar en nuestro país es el traslado de las colmenas a plantaciones de *Eucalyptus grandis* en febrero, para aprovechar su floración y continuar la temporada productiva. Al final de la floración (mayo), las colonias son cosechadas y retiradas de la forestación. En esas condiciones de estrés nutricional, donde las abejas se alimentan mayoritariamente de polen de *E. grandis*, se favorece la infección por *N. ceranae* y las colonias se debilitan notoriamente (Branchiccela *et al*, 2019).

La única medida terapéutica para controlar la nosemosis es el uso de fumagilina (Fries, 2010). Sin embargo, su uso presenta varias desventajas, puede dejar residuos en la miel afectando su calidad para el consumo y solo es eficaz para eliminar la etapa vegetativa del ciclo de vida, las esporas maduras son resistentes a este tratamiento. Además, se ha demostrado que la fumagilina solo es eficaz temporalmente para reducir la carga del parásito (Williams *et al*; 2008). El uso de este compuesto está prohibido en Europa (Fries, 2010; Higes, *et al*; 2015) y en Uruguay, se encuentra habilitado sólo para los criaderos de reinas (MGAP, 2010).



Figura 6.- Distribución de *N. ceranae* en Uruguay, 2011. Los departamentos en naranja son aquellos en los que se detectó la presencia del microsporidio. Modificado de Anido, 2015.

- *Varroa destructor*

Varroa destructor es un ácaro parásito con una aparición reciente en *A. mellifera*, siendo su hospedador original la abeja asiática *A. cerana*. Este parásito se ha dispersado en todo el mundo en un corto período de tiempo, excepto en Australia, donde aún no se han reportado casos (Boecking y Genersch, 2008; Oldroyd, 1999; Rosenkranz, 2010).

Se ha descrito que en *A. cerana* el ácaro se reproduce solo en las larvas de los zánganos (producidos solo en temporadas). Los zánganos son muy débiles para abrir el opérculo y las obreras pueden descuidar voluntariamente estas celdas no ayudando a los zánganos a emerger, conteniendo de esta forma a las varroas dentro de las celdas y evitando su multiplicación (Rath, 1999). El parásito presenta mayor patogenicidad en *A. mellifera* porque se reproduce tanto en celdas de zánganos como de obreras, lo que permite su multiplicación durante todo el año (Martin, 1998, 2001).

El ciclo de varroa puede separarse en dos fases, la forética y la reproductiva (Figura 7). La fase forética involucra únicamente a la hembra del ácaro, que utiliza a la abeja adulta como vector de transporte y fuente de alimento. En esta fase las abejas participan en la propagación de varroa dentro y entre las colmenas de abejas de forma involuntaria. La fase reproductiva ocurre en dos etapas: el ácaro se acopla a una abeja que lo transporta a las celdas con cría abierta e ingresa a las mismas. Las varroas hembras son capaces de reconocer la edad o función de la abeja adulta así como de las crías que posteriormente parasitarán (Kuenen y Calderone, 1997; Rosenkranz *et al.*, 2010). Este reconocimiento es posible porque *V. destructor* es capaz de censar compuestos químicos procedentes de la cutícula de las abejas (Le Conte *et al.*, 1994). El ácaro hembra que entra en la celda pone un huevo macho y luego huevos de hembras. Las crías se aparean entre sí y se alimentan de los cuerpos grasos de las pupas y posteriormente de la abeja adulta. Cuando la abeja adulta sale de la celda, las varroas hembras fecundadas se encuentran listas para invadir y multiplicarse en otras celdas (Nazzi y Le Conte, 2016; Ramsey *et al.*, 2019).



Figura 7.- Ciclo de vida resumido de *V. destructor*. En el mismo se visualiza las dos etapas de la varroa. La fase forética involucra únicamente a la hembra del ácaro, que utiliza a la abeja adulta como vector de transporte y fuente de alimento. En la fase reproductiva el ácaro hembra que entra en la celda pone huevos. Las crías se aparean entre sí y se alimentan de los cuerpos grasos de las pupas y posteriormente de la abeja adulta (Rosenkranz *et al.*, 2010).

Las abejas que fueron parasitadas durante su desarrollo presentan comportamientos distintos a las abejas que no fueron parasitadas; muestran una menor capacidad de aprendizaje, comienzan a pecorear antes, se ausentan de la colmena por largos períodos, poseen una menor tasa de retorno y una menor vida media. Además, la respuesta inmune puede verse debilitada, lo que podría favorecer la infección por otros patógenos (Amdam *et al.*, 2004; Annoscia *et al.*, 2019; Koleoglu *et al.*, 2018; Kralj *et al.*, 2007; Yang y Cox-Foster, 2005)

Además de los efectos directos, *V. destructor* es capaz de actuar como transmisor de virus ARN, entre ellos el Virus Kashmir (KBV), el Virus de la cría ensacada (SBV), el Virus de la Parálisis Aguda ABPV, el Virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV) y el Virus de las alas deformes (DWV) (Boecking y Genersch, 2008; Yue y Genersch, 2005).

Varroa destructor se encuentra distribuido en casi todo Uruguay, estando presente en la mayoría de las colmenas (Figura 8, Anido *et al.*, 2015), lo que lleva a la necesidad de aplicar productos acaricidas para evitar la pérdida de las mismas. Los tratamientos disponibles se basan en el uso de acaricidas sintéticos y orgánicos (Maggi *et al.*, 2011;

Rosenkranz *et al.*, 2010). Los acaricidas sintéticos habilitados para su uso en nuestro país son el organofosforado cumafós, los piretroides fluvalinato y flumetrina, y la formamida amitraz, que son administrados en otoño luego de la cosecha (Campá y Harriet, 2007). Si bien son efectivos para el control del ácaro, se ha observado la aparición de resistencia así como la generación de residuos que permanecen en la colmena (Harriet *et al.*, 2017; Rosenkranz *et al.*, 2010).

Como alternativa a los acaricidas sintéticos se dispone de acaricidas orgánicos como el ácido oxálico, ácido fórmico, ácido láctico y timol (Rosenkranz *et al.*, 2010). Éstos se pueden aplicar antes de la primavera (en ausencia de la cría para asegurar mayor efectividad) porque una de las ventajas de estos compuestos es que son volátiles y no permanecen en la cera y miel (Rosenkranz *et al.*, 2010). Sin embargo, pueden no resultar tan efectivos.



Figura 8.- Distribución de *V. destructor* en Uruguay, 2011. Los departamentos en naranja son aquellos en los que se detectó la presencia del ácaro. Modificado de Anido, 2015.

- Virus

Los virus son agentes infecciosos intracelulares obligados que dependen de la maquinaria de su hospedero para su multiplicación. Al hacerlo, pueden causar un daño significativo a sus hospederos y expresar una variedad de síntomas. En el caso de las abejas melíferas, con el desarrollo de las tecnologías moleculares y de secuenciación masiva, se han descubierto cerca de 80 virus que las infectan, la mayoría de ellos de forma asintomática (Beaurepaire *et al.*, 2020). En general se trata de pequeñas partículas icosaédricas que contienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, que varía entre 1,1 y 10 kpb (Bailey, 2003; Beaurepaire *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2013). El mecanismo de acción de estos virus, en líneas generales, ocurre de la siguiente forma: ingresa al individuo, inyecta ARN en el citoplasma de las células y utiliza la maquinaria del hospedero (los ribosomas) para transcribir y generar nuevas proteínas virales, que se ensamblarán como una partícula viral y se liberarán de la célula infectada para repetir el ciclo (Holmes, 2009). Recientemente se han identificado virus de ARN con un genoma monocatenario de sentido negativo, o incluso virus con un genoma de ADN (Levin *et al.*, 2016; Levin *et al.*, 2019; Remnant, 2017).

Entre los virus descritos, siete han despertado mayor interés por su impacto negativo en la salud de las abejas, generando síntomas específicos que afectan la morfología, fisiología o su comportamiento. A modo de ejemplo, el virus de las alas deformes (DWV) ocasiona que las abejas nazcan con las alas atrofiadas o sin alas, y el abdomen acortado (Miranda 2010).

La patogenicidad de los virus así como el desarrollo de síntomas dependen de la carga viral, de los tejidos u órganos donde se multipliquen (Tabla 1) y de la vía de transmisión (Amiri *et al.*, 2015; Schurr *et al.*, 2019). Generalmente el desarrollo de síntomas se asocia a infecciones con títulos virales muy altos. Sin embargo, se ha observado que estos virus pueden permanecer en las colmenas sin desarrollar síntomas, o mostrando síntomas leves (Levin *et al.*, 2016; Levin *et al.*, 2019; Remnant, 2017). De esta forma, muchas infecciones persistentes o asintomáticas pueden pasar desapercibidas y causar daños a largo plazo en la colmena. Además, los síntomas de las infecciones virales pueden ser “camuflados” por aquellos que provienen de otras enfermedades o factores

ambientales estresantes, como la intoxicación con pesticidas (Anderson y Gibbs, 1988; Miranda, 2012).

En la naturaleza, los virus que infectan a las abejas se pueden transmitir de forma horizontal o vertical dentro de la especie (Beaurepaire *et al.*, 2020; Grozinger y Flenniken, 2019). La transmisión vertical se da de las reinas o los zánganos a la descendencia (Grozinger y Flenniken, 2019), mientras que la transmisión horizontal ocurre entre individuos a través de la comida (trofalaxis), vectores como el ácaro *V. destructor* o al compartir recursos florales (Beaurepaire *et al.*, 2020; Grozinger y Flenniken, 2019; Klee *et al.*, 2011). Además, puede haber transferencia horizontal de virus entre las abejas melíferas (exóticas) a abejas nativas, conocido como “*spillover*” o derrame de patógenos. Este tipo de transmisión también puede ocurrir mediante vectores (*V. destructor*) o al compartir recursos florales (Beaurepaire *et al.*, 2020; Grozinger y Flenniken, 2019; Martin *et al.*, 2012).

Tabla 1: Virus que afectan a las abejas melíferas. Se listan aquellos virus que causan síntomas y efectos negativos en la colmena

Virus	Tropismo	Sintomatología	Referencia
Virus de la parálisis aguda (ABPV)	Sistema nervioso y glándulas hipofaríngeas.	Abejas temblorosas, no pueden volar, presentan oscurecimiento y pérdida del pelo del tórax y abdomen. Se observan abejas débiles caminando en frente a la colmena.	Bailey <i>et al.</i> , 1963; Chen y Siede, 2007
Virus de las celdas reales negras (BQCV)	Tejido del intestino.	Larvas de reina amarillentas con apariencia de saco que se asemeja al SBV y con el tiempo evolucionan a marrón oscuro. Las pupas infectadas se vuelven marrones y mueren, celdas reales con paredes de color marrón oscuro a negro.	Bailey, 2003; Chen y Siede, 2007
Virus de la parálisis crónica (CBPV)	Sistema nervioso, tracto alimenticio, mandíbulas y glándulas hipofaríngeas.	Síndrome 1: Abejas temblorosas, abdomen hinchado, no pueden volar. Se observan abejas débiles caminando en frente a la colmena, se reúnen en grupos en las áreas más cálidas del nido, mueren a los pocos días	Bailey <i>et al.</i> , 1967; Chen y Siede, 2007
		Síndrome 2 (<i>Black robbers</i>): abejas sin pelo, presentan oscurecimiento, de apariencia grasosa, brillante, sufren ataques de mordeduras por abejas sanas. La esperanza de vida de las abejas adultas es baja	
Virus de las alas deformes (DWV)	Todo el cuerpo	Alas arrugadas o mal formadas, abdomen acortado, parálisis, reducción de la vida media para abejas obreras y zánganos, problemas de aprendizaje, problemas de comportamiento de búsqueda de alimentos	Benaets <i>et al.</i> , 2017; Lanzi <i>et al.</i> , 2006; McMahon <i>et al.</i> , 2016; Yue y Genersch, 2005
Virus de la cría ensacada (SBV)	Glándulas hipofaríngeas, citoplasma de las células musculares y del extremo traqueal de las larvas	Fallo en la formación de la pupa, larvas hinchadas por acumulación de líquido ecdisial que contiene partículas virales, pecoreo a temprana edad, reducción de la vida adulta y de las actividades metabólicas.	Anderson y Giacon, 1992; Bailey <i>et al.</i> , 1964; Bailey y Fernando, 1972

- Virus de las Alas Deformes (DWV)

El virus de las alas deformes (DWV) (Figura 9) es el virus que más atención ha recibido durante los últimos años por su vinculación con los episodios de pérdidas de colonias (Beaurepaire *et al.*, 2020; Genersch y Aubert, 2010; Highfield *et al.*, 2009). Pertenece a la familia *Iflaviridae* (Baker y Schroeder, 2008; Miranda y Genersch, 2010) y su genoma tiene aproximadamente 10,000 nucleótidos (Dalmon *et al.*, 2017). La propagación global de *V. destructor* impulsó la dispersión de este virus alrededor del mundo (Wilfert *et al.*, 2016)

Los virus de ARN tienen altas tasas de mutación y existen como una población diversa de variantes o cuasiespecies (Domingo y Holland, 2003). Las cuasiespecies son un grupo de variantes, genéticamente ligadas a través de mutaciones y organizadas alrededor de una secuencia maestra (Domingo *et al.*, 2006; Luring y Andino, 2010). Actualmente, se han identificado tres variantes maestras para el DWV: **Tipo A** (Ryabov *et al.*, 2014), **B** (Ongus *et al.*, 2004) y **C** (Mordecai *et al.*, 2016). Estas variantes pudieron resultar de una co-evolución del hospedero (abeja melífera), del vector (*V. destructor*) y el virus (DWV), posiblemente disminuyendo la virulencia del DWV para optimizar su transmisión por *V. destructor* en la población de abejas melíferas (Dalmon *et al.*, 2017).

El DWV-A es el más frecuente y se ha relacionado con la pérdida de colmenas (Martin *et al.*, 2012; Schroeder y Martin, 2012). El DWV-B (originalmente llamado *Varroa destructor* virus-1 o VDV-1), es menos virulento que la variante A. En ensayos realizados con colmenas infestadas naturalmente con *V. destructor* se observó que la variante B es capaz de competir y desplazar a la variante A (McMahon *et al.*, 2016; Mordecai *et al.*, 2015). Los efectos del DWV-C aún se desconocen, ya que es la variante descrita más recientemente (Mordecai *et al.*, 2016).



Figura 9.- En la imagen se observa una abeja adulta con alas deformadas producto de la infección con DWV. Imagen tomada de Rosenkrantz *et al* (2010)

Inmunidad de las abejas melíferas

Las abejas son insectos eusociales, en una colonia conviven miles de individuos de diferentes generaciones lo que favorece la transmisión de plagas y patógenos (Cremer *et al.*, 2007; Schmid-Hempel, 1998). Para combatir estas infecciones, los insectos han desarrollado mecanismos comportamentales de defensa conocidos como “inmunidad social” (Cremer *et al.*, 2007; Evans y Spivak, 2010). Algunos ejemplos son el comportamiento higiénico (limpieza entre abejas, aseo de la colmena removiendo abejas muertas y crías infectadas); la fiebre social (las abejas obreras se agrupan para lograr alcanzar temperaturas que resultan inhóspitas para el desarrollo de parásitos) o la recolección de resinas de plantas por las abejas pecoreadoras y su depósito en la colmena como propóleos (Figura 10, ((Evans *et al.*, 2006; Gómez-Moracho *et al.*, 2017; Pritchard, 2016; Simone *et al.*, 2009; Simone *et al.*, 2014).

Además de los mecanismos de defensa social, las abejas tienen mecanismos de defensa individual, incluyendo barreras mecánicas, fisiológicas e inmunes (Cremer *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2006; Evans y Spivak, 2010; Gómez-Moracho *et al.*, 2017). Las barreras mecánicas incluyen la cutícula y el tejido epitelial, los cuales previenen que los microorganismos se adhieran o ingresen al organismo en una primera instancia, mientras que las defensas fisiológicas incluyen cambios en el pH y otras condiciones químicas del intestino (Crailsheim y Riessberger-Gallé, 2001). Si los patógenos son

capaces de superar estas barreras, es entonces que se activa la respuesta inmune innata celular y humoral del insecto (Figura 10)(Evans y Spivak, 2010).

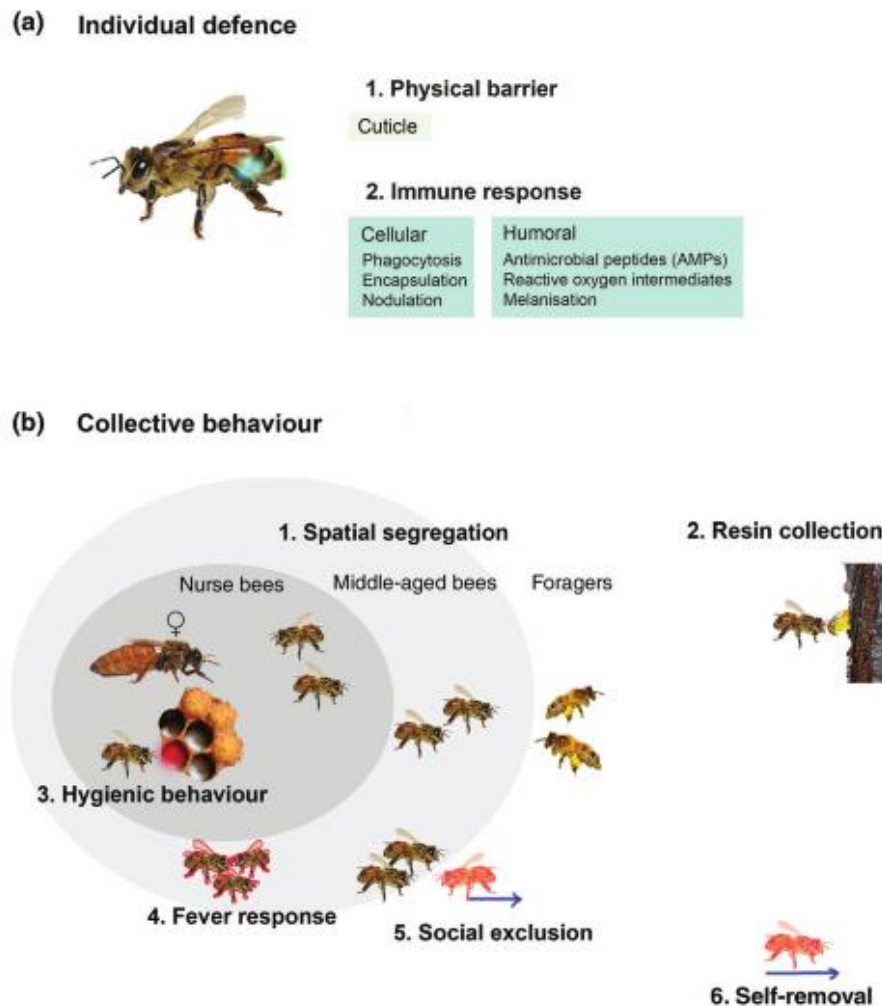


Figura 10.- Mecanismos de defensa de las abejas contra patógenos. (a) A nivel individual, la cutícula es una barrera mecánica y bioquímica contra la infección. (b) A nivel colectivo las abejas presentan la inmunidad social, que incluye el comportamiento higiénico, la segregación espacial, la colecta de resinas, la exclusión social y la auto exclusión de abejas infectadas. Imagen tomada de Gómez-Moracho *et al.* (2017).

La respuesta humoral consiste en la secreción de péptidos antimicrobianos hacia la hemolinfa (Hoffman *et al.*, 2003). Se han detectado cuatro péptidos antimicrobianos en las abejas: defensinas, abaecinas, himenoptecinas y apidecinas (Casteels *et al.*, 1989, 1990, 1993; Evans, 2006; Larsen *et al.*, 2019).

Por otro lado, la respuesta inmune celular está mediada por hemocitos, granulocitos y plasmotocitos que realizan tareas como: fagocitosis, encapsulación, nodulación y melanización de microorganismos y cuerpos extraños (Wilson-rich *et al.*, 2009).

El sistema inmune es el sistema fisiológico más costoso de los insectos (Fischer y Schmid-Hempel, 2005). Una respuesta inmunitaria elevada puede conducir a una reducción de la productividad de las colmenas en las abejas melíferas (Evans y Pettis, 2005) y una disminución de la supervivencia individual en abejorros (Moret y Schmid-Hempel, 2000).

Uso del propóleo como estrategia para mejorar la salud de las abejas melíferas

Los antecedentes planteados demuestran la necesidad de buscar estrategias naturales para la prevención o control de la infección por plagas y patógenos. Una alternativa interesante es el uso de propóleos, que se ha utilizado empíricamente en la apicultura para la prevención de enfermedades de las abejas durante años.

Al estar presente en las colmenas en estado sólido y no poder ser consumido directamente por las abejas, los apicultores lo utilizan en extractos etanólicos (EEP).

Las primeras experiencias de uso en abejas fueron para la prevención y control de la Loque Americana, la enfermedad de origen bacteriano más severa y destructiva que afecta a la cría de las abejas (Genersch *et al.*, 2006; Antúnez *et al.*, 2008). El agente causal es *Paenibacillus larvae*, un bacilo Gram positivo, formador de esporas (Genersch *et al.*, 2006). Esta enfermedad es altamente contagiosa, por lo que la recomendación para evitar su propagación es la quema completa de la colmena (abejas y material). Antúnez *et al.*, (2008) demostraron que el EEP es capaz de inhibir el crecimiento de *P. larvae in vitro* y que su administración en abejas adultas es segura. Además, encontraron que su administración en colmenas naturalmente infectadas, es capaz de disminuir el número de esporas en miel. A partir de este trabajo se comenzó a recomendar el uso el EEP como medida preventiva en colmenas expuestas a esporas de *P. larvae*, pero que aún no habían desarrollado síntomas. Esta medida, en conjunto con la quema de las colmenas

que presentaban síntomas, logró disminuir la prevalencia de este patógeno en el país de 51% en 2002 a 2% en 2011 (Antúnez *et al.*, 2012).

Recientemente, otros investigadores evaluaron el uso de EEP para la prevención y control de otros patógenos en condiciones de laboratorio. Arismendi *et al.* (2018), Suwannapong *et al.* (2018) y Naree *et al.* (2021) demostraron que la administración de EEP es capaz de disminuir el número de esporas de *N. ceranae* en abejas infectadas, mientras que Garedew *et al.* (2002, 2004) y Popova *et al.* (2014) observaron que tiene efecto narcótico y acaricida sobre *V. destructor*.

A su vez otros trabajos han reportado que la administración del EEP estimula la expresión de varios genes, por ejemplo la himenoptecina, glucosa oxidasa, abaecina, defensina y citocromo P450s (Johnson *et al.*, 2012; Simone *et al.*, 2009, 2017).

Considerando estos antecedentes, el EEP podría ser una estrategia natural que logre fortalecer la inmunidad de las abejas y permita disminuir la infección por plagas y patógenos.

Hipótesis

La administración de extracto etanólico de propóleos (EEP) en abejas es capaz de modular su sistema inmune, disminuyendo la infección por patógenos y aumentando así su supervivencia. Por otro lado, la administración del EEP en colmenas de producción, impacta sobre la fortaleza de la colmena, su estado sanitario y la producción de miel.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración del EEP, como estrategia para mejorar la salud de las abejas melíferas.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la administración del EEP sobre el nivel de infección por los patógenos *N. ceranae* y DWV en abejas adultas, a nivel individual.
- Evaluar el efecto de la administración del EEP sobre la expresión de genes vinculados a la inmunidad en abejas adultas, a nivel individual.
- Evaluar el efecto de la administración del EEP sobre la fortaleza en colmenas de producción.
- Evaluar el efecto de la administración del EEP sobre la infección natural por *N. ceranae* y *V. destructor* en colmenas de producción.

Capítulo 1: Efecto del EEP sobre la salud de las abejas melíferas a nivel individual.

En los últimos años se han observado pérdidas de colmenas alrededor del mundo. Entre las principales causas se encuentra la presencia de múltiples plagas y patógenos, la intoxicación con pesticidas, y la desnutrición vinculada al incremento de monocultivo (Goulson *et al.*, 2015).

Entre las plagas y patógenos de mayor importancia apícola se encuentran la bacteria *Paenibacillus larvae*, el microsporidio *Nosema ceranae*, el ácaro *Varroa destructor* y diferentes virus ARN (Beaurepaire *et al.*, 2020; Genersch *et al.*, 2006; Higes *et al.*, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010). En muchos casos, es necesaria la aplicación de tratamientos que permitan prevenir o eliminar a estos organismos. La aplicación de sustancias químicas puede provocar el desbalance en la homeostasis entérica de las abejas, favoreciendo la aparición de organismos resistentes y la generación de residuos que permanecen en la miel afectando su calidad para el consumo (Boncristiani *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013; Harriet *et al.*, 2017; Rosenkranz *et al.*, 2010). Esto hace necesario la búsqueda de estrategias alternativas naturales. Una opción interesante es el uso de extracto etanólico de propóleos. Esta solución puede ser producida por los apicultores a partir del propóleos obtenido de sus propias colmenas y ya se ha reportado que es capaz de inhibir el desarrollo de algunos patógenos de importancia apícola (Antúñez *et al.*, 2008; Popova *et al.*, 2014; Arismendi *et al.*, 2018).

En este capítulo se abordan los primeros dos objetivos específicos de esta tesis, la evaluación del efecto de la administración del EEP sobre los patógenos *N. ceranae* y DWV, así como en la expresión de genes vinculados a la inmunidad de la abeja melífera a nivel individual.

Materiales y Métodos

- Preparación del EEP

Se obtuvo una muestra de Extracto Etanólico de Propóleos (EEP) comercial (RP-60 2165) de la empresa Apiter (Montevideo, Uruguay) en cantidad necesaria para realizar todos los experimentos incluidos en esta tesis. Dicho extracto fue caracterizado previamente por el proveedor, estando constituido por 60.38% de sólidos y 8.82 mg de flavonoides por gramo de producto. En base a este extracto, se prepararon tres dosis de trabajo: D1= 0.5g /100mL, D2= 2g/100mL y D3= 5g/100mL (0.5%, 2% y 5% respectivamente). Las diluciones se realizaron con alcohol etílico absoluto.

- Obtención de esporas de *N. ceranae*

Se preparó una suspensión de esporas de *N. ceranae* a partir de abejas adultas (pecoreadoras), de colmenas naturalmente infectadas con este microsporidio, provenientes de un apiario localizado en el departamento de Rocha, Uruguay. Para la purificación de las mismas se diseccionaron 200 abejas, se les extrajo el intestino medio y se homogeneizaron en 20 mL de agua destilada estéril. El homogeneizado se filtró a través de gasas y luego se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de esporas se lavó tres veces en 20 mL agua estéril. Finalmente, las esporas se suspendieron en 10 mL de agua destilada estéril y se cuantificó el número de esporas en cámara de Neubauer (Rodríguez-García, *et al* 2018).

- Evaluación de la toxicidad del EEP

Con el fin de evaluar el potencial efecto tóxico del EEP en abejas a nivel individual, se empleó un modelo de cría de abejas en laboratorio. Se utilizaron cuadros operculados conteniendo abejas a punto de emerger, pertenecientes a colmenas aparentemente sanas del apiario experimental de Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las colmenas no presentaban síntomas clínicos de varroasis, nosemosis, Loque Americana o virosis.

Los cuadros se incubaron a 30°C hasta que las abejas comenzaron a emerger. Las abejas recién emergidas se colocaron en jaulas (n=80 abejas), se dividieron en 7 grupos

(D1T, D2T, D3T, D1S, D2S, D3S, C) y cada grupo recibió un tratamiento diferente. El ensayo se realizó por triplicado. Tres grupos se alimentaron diariamente con jarabe de sacarosa 50% suplementado con EEP en las dosis 0,5, 2 y 5% (D1T, D2T, D3T, respectivamente); otros tres grupos se alimentaron una vez por semana con jarabe de sacarosa 50% suplementado con EEP en las dosis 0,5, 2 y 5%, (y el resto de los días se alimentaron con jarabe de sacarosa al 50% (D1S, D2S, D3S), por último, el grupo control (C) que sólo recibió jarabe de sacarosa al 50%.

- Efecto de la administración de EEP en abejas sanas

Se utilizaron cuadros con cría operculada conteniendo abejas a punto de emerger, provenientes de colmenas aparentemente sanas de un apiario comercial ubicado en Colonia, Uruguay. Las colmenas no presentaban síntomas clínicos de varroosis, nosemosis, Loque Americana ni virosis. Cuando las abejas comenzaron a emerger se colocaron en jaulas (n=80 abejas) y se dividieron en 6 grupos (D1, D2, D1N, D2N, N y C). Los grupos D1 y D2 recibieron una vez por semana jarabe de sacarosa 50% suplementado con EEP en las dosis 0,5 y 2%, respectivamente. Los grupos D1N y D2N recibieron la misma dosis de EEP y además se inocularon con 50.000 esporas de *N. ceranae*/abeja. El grupo N se inoculó con 50.000 esporas de *N. ceranae*/abeja y se utilizó como control de infección. Por último, el grupo C fue el grupo control que sólo recibió jarabe de sacarosa al 50%.

En detalle, a las 20-24 horas de ser enjauladas las abejas de los grupos D1N, D2N y N se inocularon *ad libitum* con 1 ml de esporas frescas de *N. ceranae* en jarabe de sacarosa al 50%, mientras que las abejas de los grupos D1, D2 y C se alimentaron *ad libitum* con jarabe de sacarosa al 50%. Una vez que el jarabe se consumió por completo (aproximadamente 24 h después), las abejas se alimentaron *ad libitum* con jarabe de sacarosa fresco (grupos C y N) o jarabe de sacarosa suplementado con EEP (grupos D1, D1N, D2 y D2N). El EEP se administró una vez por semana, durante 24 horas.

Se tomaron muestras de abejas vivas (3 abejas por jaula, de 3 jaulas por grupo) a distintos tiempos post-inoculación (Día 3, 6, 10 y 13) para evaluar el nivel de infección por *N. ceranae*. Las abejas se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis. A la vez, 6 días post-inoculación se colectaron abejas vivas (4 abejas por jaula, de 3 jaulas por

grupo) para evaluar la expresión de diferentes genes. Dichas abejas se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis para evitar la degradación del ARNm.

- Efecto de la administración de EEP en abejas sintomáticas

Se repitió el ensayo anterior, pero en este caso se utilizaron cuadros con cría operculada conteniendo abejas a punto de emerger, provenientes de colmenas de un apiario comercial ubicado en Canelones, Uruguay. En este caso, las colmenas mostraron signos clínicos de varroosis (ácaros foréticos) y virosis (deformación o ausencia de alas). Los análisis de laboratorio confirmaron una tasa de infestación por *V. destructor* del 35% y la presencia del virus DWV.

En los tres ensayos descritos previamente las jaulas se inspeccionaron cada día, se registró la mortalidad y se retiraron los individuos muertos. A la vez se determinó el consumo de alimento mediante la estimación del cambio en el volumen de jarabe, en las jeringas graduadas que se utilizaron como alimentadores. El consumo de alimento por abeja se calculó teniendo en cuenta el número de abejas sobrevivientes cada día.

Salvo que se indique lo contrario, en todos los ensayos el alimento de las jeringas se cambió cada 48 horas por alimento fresco. En el caso del EEP administrado 1 vez por semana, se administró durante 24 horas.

- Análisis del nivel de infección por *Nosema ceranae*

Se diseccionó el abdomen de cada abeja de manera individual, se colocó en un tubo de 2mL (estéril) con 1 mL de agua destilada estéril y se homogeneizó con varilla de vidrio. Posteriormente se colocaron 10 µL del homogenato en cámara de Neubauer y se realizó el conteo de esporas de *N. ceranae* a 400x (Human *et al.*, 2013).

El número de esporas se determinó de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ esporas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Área de los cuadrados contados} \times \text{Profundidad de la cámara}}$$

(Human *et al.*, 2013).

- Extracción y retrotranscripción de ARN

Se realizó la extracción de ARN de las abejas colectadas 6 días post-inoculación con *N. ceranae*. La misma se realizó de manera individual utilizando el *PureLink RNA Mini kit* (Invitrogen), según lo recomendado por el fabricante. Una alícuota del ARN obtenido se trató con DNAsa (Invitrogen) y se empleó como molde para generar el ADNc, empleando el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem).

- qPCR

Se evaluó la expresión de diferentes genes asociados a la respuesta inmune de la abeja (vitelogenina, himenoptecina, defensina, abaecina y glucosa oxidasa) mediante qPCR utilizando *primers* específicos (Tabla 2). En dichas muestras también se evaluó la carga viral de DWV empleando *primers* específicos para este virus (Tabla 2). Como gen de referencia se utilizó el gen que codifica para la proteína ribosómica 5S (RPS5) (Evans, 2006).

Las reacciones consistieron en 1X Power SYBR® Green Master Mix (Invitrogen), 0,3 µM de cada *primer*, 2 µl de la dilución 1/10 del ADNc obtenido y agua libre de RNasa, en un volumen final de 20 µl. El programa consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min y 40 ciclos de PCR de tres pasos a 95°C durante 15s, 50°C durante 30s y 60°C durante 30s. Se midió la fluorescencia durante la etapa de elongación. Se incluyó una curva de desnaturalización (de 65 a 95 °C, con incrementos de 0,5°C cada 0,05 s) al final del programa para determinar la temperatura de *melting*. En cada placa se incluyeron controles negativos (sin ADN) y una curva estándar. La curva estándar se construyó de forma independiente para cada ensayo, a partir de la mezcla de 1µL de cada muestra de ADNc, y cuatro diluciones seriadas 1/10. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo por triplicado, utilizando un sistema BIO-RAD CFX96™ Real-Time.

La relación de expresión entre los diferentes genes de interés o el nivel de DWV y el gen RPS5 se analizó de acuerdo a lo descrito por Pfaffl (2001).

Tabla 2.- Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación y cuantificación de genes mediante qPCR.

Primer	Secuencia 5' – 3'	Virus/Gen	Referencia
GOx1	GAGCGAGGTTTCGAATTGGA	Glucosa Oxidasa	Johnson, <i>et al.</i> , 2009
GOx2	GTCGTTCCCCGAGATTCTT		
Vg1	AGTTCGACCGACGACG	Vitelogenina	Corona <i>et al.</i> , 2007
Vg2	TTCCCTCCACGGAGTCC		
HYM1	ATATCCCGACTCGTTTCCGA	Hymenoptecina	Yang y Cox-Foster, 2005
HYM2	TCCCAAACCTCGAATCCTGCA		
RPS5-F	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	Proteína	Jay D. Evans, 2006
RPS5-R	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	Ribosomal 5s	
ABA1	AGATCTGCACACTCGAGGTCTG	Abaecina	Yang y Cox-Foster, 2005
ABA2	TCGGATTGAATGGTCCCTGA		
DEF 1	TGTCGGCCTTCTCTCATGG	Defensina	Yang y Cox-Foster, 2005
DEF2	TGACCTCCAGCTTTACCCAAA		
DWV1	CTGTATGTGGTGTGCCTGGT	DWV	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
DWV2	TTCAAACAATCCGTGAATATAGTGT		

- Análisis estadísticos

El efecto de la administración de EEP en los parámetros estudiados se analizó mediante el test estadístico ANOVA y prueba de Tukey cuando los datos se ajustaban a los supuestos de la estadística paramétrica, o pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney en los casos que no.

Se construyeron curvas de supervivencia utilizando el método de Kaplan-Meier y los resultados se compararon estadísticamente utilizando la prueba de Log-rank.

En todos los casos, los valores de p inferiores o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism versión 8.

Resultados

Toxicidad del EEP en abejas melíferas

La administración de jarabe suplementado con EEP en dosis 0,5, 2 y 5% todos los días (grupos D1T, D2T y D3T) a abejas melíferas recién emergidas sanas resultó tóxica, reduciendo significativamente la vida media de las abejas (Log – Rank: D1T vs C $p < 0,0001$; D2T vs C $p < 0,0001$; D3T vs C $p < 0,0001$; D1T vs D2T $p < 0,0001$; D2T vs D3T $p < 0,0001$).

Por otro lado, la administración de jarabe suplementado con EEP al 2 y 5% (D2S y D3S) una vez a la semana también resultó tóxica (Log – Rank: D2S vs C $p = 0,03$; D3S vs C $p < 0,0001$). Sin embargo, no se observó mortalidad al administrar la dosis 0.5% (D1S) (Figura 11). Teniendo en cuenta esos resultados en los ensayos posteriores se administró el EEP una vez a la semana en D1 y D2.

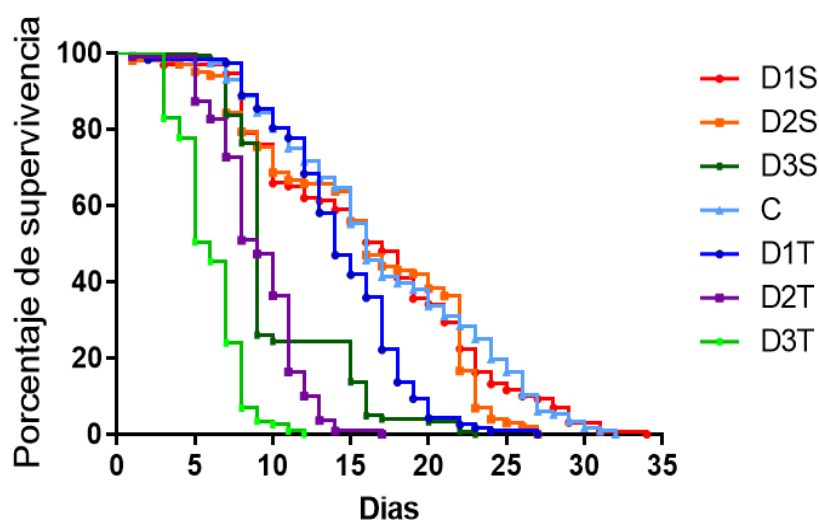


Figura 11.- Supervivencia de las abejas melíferas alimentadas con jarabe de sacarosa suplementado con EEP en dosis 0,5, 2 y 5% todos los días (D1T, D2T y D3T) y una vez por semana (D1S, D2S y D3S). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe.

Todos los grupos presentaron un consumo de alimento similar, no habiendo diferencias significativas entre ellos (Kruskal-Wallis test $p = 0,07$) (Figura 12).

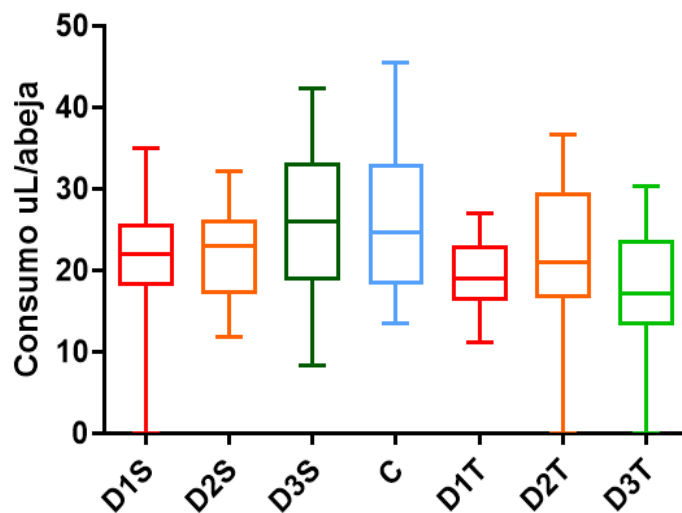


Figura 12.- Consumo de jarabe en abejas melíferas alimentadas con jarabe de sacarosa suplementado con EEP en dosis 0,5, 2 y 5% todos los días (D1T, D2T y D3T) y una vez por semana (D1S, D2S y D3S). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Efecto del EEP en abejas melíferas sanas infectadas experimentalmente con *N. ceranae*

En las abejas melíferas sanas que se infectaron experimentalmente con esporas de *N. ceranae* se desarrolló exitosamente la infección (grupos D1N, D2N y N), mientras que en las abejas que no fueron inoculadas (grupos C, D1 y D2), no se observaron esporas. Esto indica que las abejas estaban libres de *N. ceranae* al emerger y que no se produjo contaminación cruzada entre grupos durante el ensayo.

El número de esporas aumentó gradualmente en el transcurso del tiempo en el grupo N, hasta alcanzar en promedio 12 millones de esporas por abejas a los 13 días post-infección.

Cuando se administró EEP a las abejas infectadas con esporas de *N. ceranae*, se observó una disminución significativa en el número de esporas por abeja a los 10 días (Kruskal-Wallis, $p > 0.0001$; Mann-Whitney, D2N vs N $p = 0,008$) y a los 13 días post-inoculación (Kruskal-Wallis, $p > 0.0001$; Mann-Whitney D1N vs N $p = 0,001$; D2N vs N $p = 0,002$) (Figura 13).

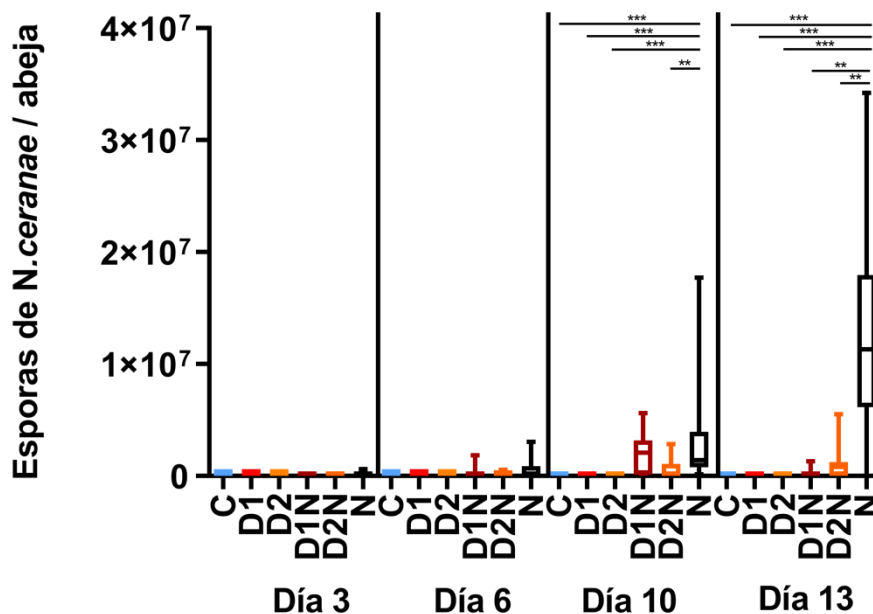


Figura 13.- Nivel de infección por *N. ceranae* en abejas sanas alimentadas con jarabe suplementado con EEP. Los grupos D1 y D2 recibieron EEP en dosis 0,5 y 2%, respectivamente, mientras que los grupos D1N y D2N recibieron EEP y se infectaron con esporas de *N. ceranae*. El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe y el grupo N corresponde al control de infección, que recibió esporas. Se observa el número de esporas a 3, 6, 10 y 13 días post-infección. Las diferencias significativas se indican con asterisco (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Solo se muestran las diferencias entre grupos, dentro de cada tiempo.

Cuantificación del DWV

Cuando se evaluó el nivel de infección de las abejas con el virus de las alas deformes se observó en todos los casos cargas virales muy bajas, siendo el CT promedio por grupo mayor a 32,09 (Tabla 3). Por este motivo no se pudo estudiar el efecto del EEP sobre el nivel de infección.

Expresión de genes vinculados a la inmunidad

Se evaluó el efecto de la administración del EEP en la expresión de diferentes genes vinculados a la inmunidad. El tratamiento con EEP en ambas dosis aumentó significativamente la expresión de himenoptecina respecto al grupo control (Figura 14, Kruskal-Wallis, $p > 0.001$; Mann-Whitney C vs D1 $p = 0.06$; C vs D2 $p = 0.004$; C vs D1N, $p = 0.003$; C vs D2N $p = 0.001$). A la vez, la administración del EEP en dosis 2 en abejas infectadas, tendió a aumentar la expresión del gen, en comparación con el grupo control de infección (Mann-Whitney, N vs D2N, $p = 0.08$).

Por su parte, la infección con *N. ceranae* también generó un aumento en la expresión de este péptido antimicrobiano (Mann-Whitney, N vs C, $p = 0.004$).

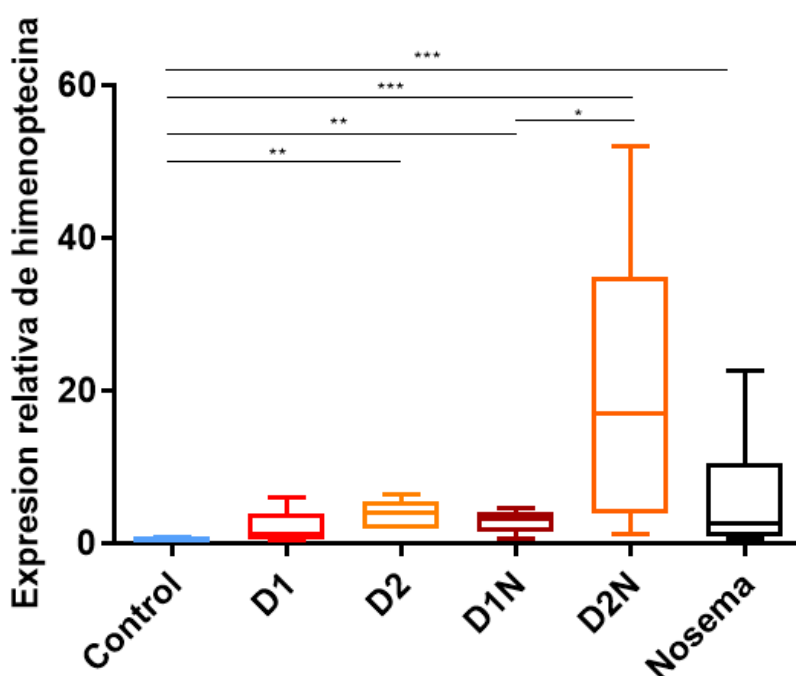


Figura 14.- Expresión del gen que codifica para la himenoptecina en abejas alimentadas con jarabe suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección. Las diferencias significativas se indican con una barra y un asterisco (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Por otro lado, se observó que el EEP no modificó la expresión de defensina (Kruskal-Wallis test, $p = 0.4$), abaecina (Kruskal-Wallis test, $p = 0.3$) o glucosa oxidasa (Kruskal-Wallis test, $p = 0.07$) (Figura 15). Finalmente, en el caso de la vitelogenina, si bien se

observaron diferencias (Kruskal-Wallis test, $p = 0,05$), al realizar la prueba de Mann-Whitney pareada entre los grupos, no se identificó qué grupo modifica la expresión de este gen ($p > 0,05$ en todos los casos)

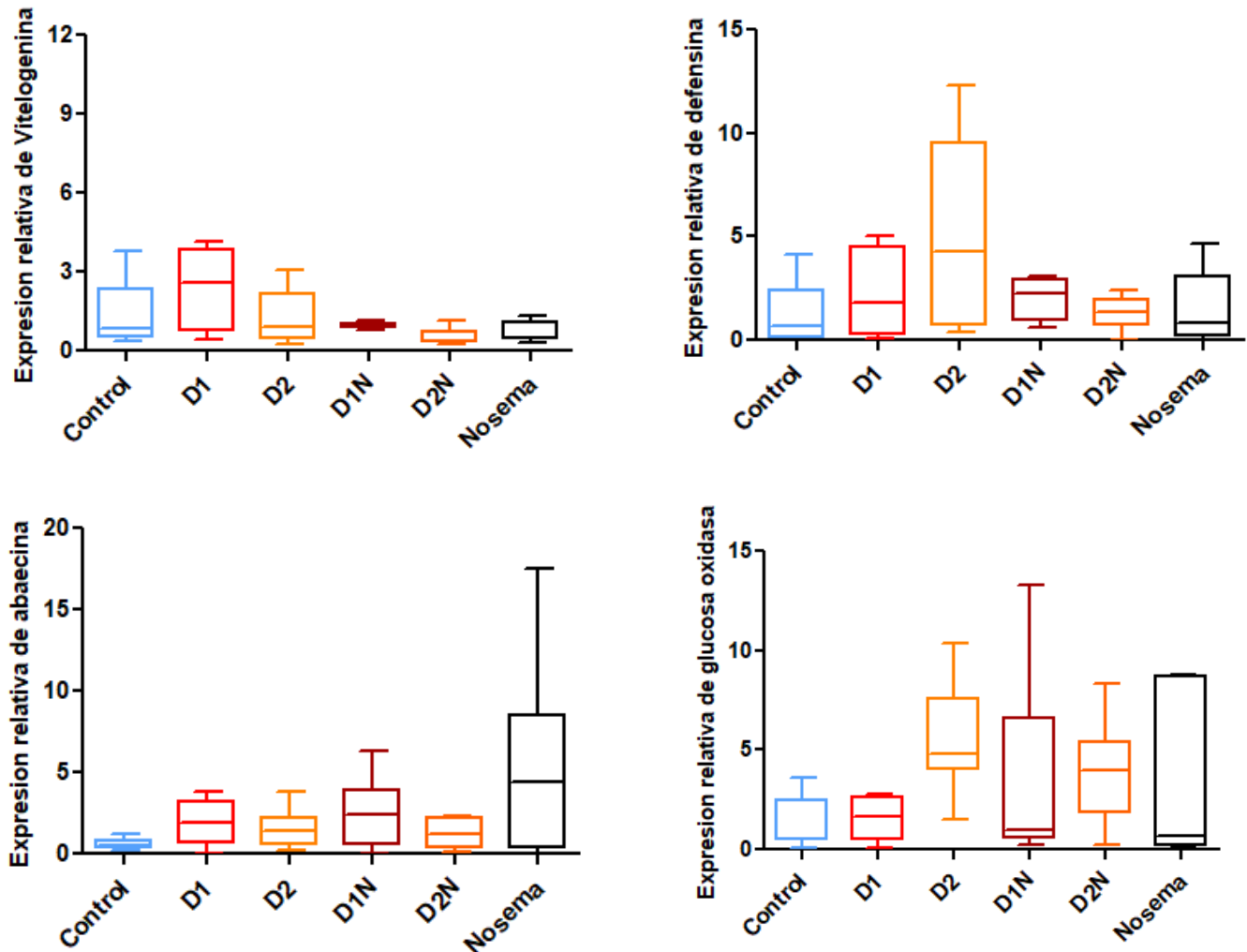


Figura 15.- Expresión de los genes que codifican para la vitelogenina, defensina, abaecina y glucosa oxidasa en abejas alimentadas con jarabe suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

En cuanto a la supervivencia de las abejas, la infección por *N. ceranae* redujo significativamente su vida media (Figura 16, Log Rank N vs C $p = 0,005$). A pesar del efecto benéfico del EEP en la disminución del nivel de infección por *N. ceranae*, no se

observó una reducción en la mortalidad ocasionada por este microsporidio. Aún más, se observó una disminución en la vida media de las abejas melíferas en aquellos grupos que consumieron el EEP (Log Rank, D1 vs C $p < 0,0001$; D2 vs C $p < 0,0001$; D1N vs C $p < 0,0001$; D2N vs C $p < 0,0001$).

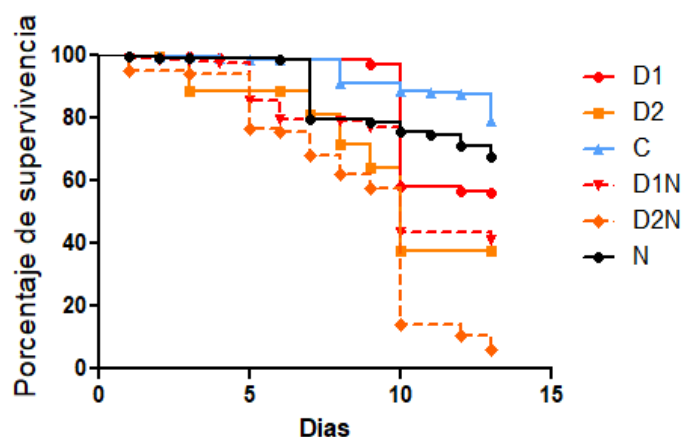


Figura 16.- Supervivencia de abejas melíferas sanas alimentadas con jarabe de sacarosa suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección.

Finalmente, se observó que el consumo de jarabe de sacarosa fue similar entre todos los grupos (Kruskal-Wallis test $p = 0.75$) (Figura 17).

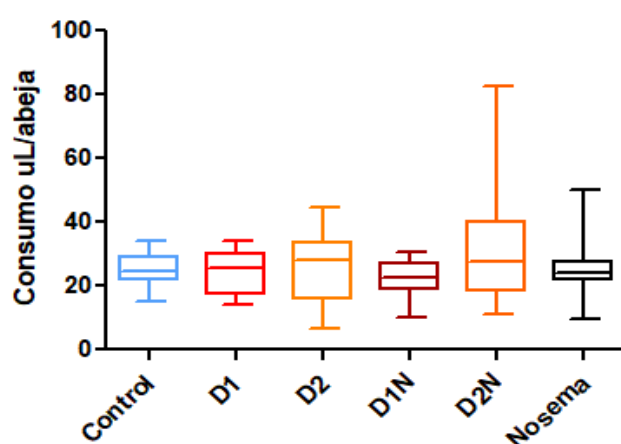


Figura 17.- Consumo de jarabe en abejas que recibieron alimento suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Efecto del extracto etanólico de propóleos en abejas melíferas infestadas naturalmente con *V. destructor* y DWV, e inoculadas con *N. ceranae*

El segundo ensayo fue similar al presentado anteriormente, pero en este caso se emplearon abejas recién emergidas, naturalmente infestadas con *V. destructor* así como con DWV. Al igual que en el ensayo anterior, las abejas estaban libres de *N. ceranae*, lo que se evidenció por la ausencia de esporas en los grupos C, D1 y D2 a diferentes tiempos de incubación (Figura 18).

En las abejas inoculadas artificialmente con *N. ceranae*, el número de esporas aumentó hasta alcanzar en el grupo N en promedio 10,5 millones de esporas por abeja a los 13 días post-infección.

La administración de EEP redujo el número de esporas del microsporidio a los 13 días post-inoculación (Kruskal-Wallis, $p > 0.0002$; Mann-Whitney, D1N vs N, $p = 0,05$; D2N vs N, $p = 0,08$).

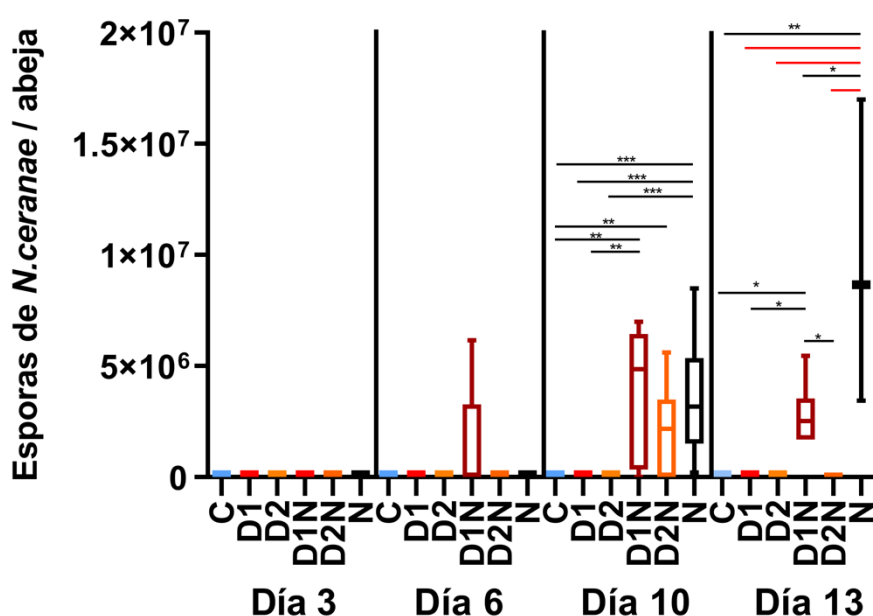


Figura 18.- Nivel de infección por *N. ceranae* en abejas con *V. destructor* y DWV alimentadas con jarabe de sacarosa suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2%. Los grupos D1 y D2 recibieron EEP en dosis 0,5 y 2%, respectivamente, mientras que los grupos D1N y D2N recibieron EEP y se infectaron con esporas de *N. ceranae*. El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe y el grupo N corresponde al control de infección, que recibió esporas. Se observa el número de

esporas a 3, 6, 10 y 13 días post-infección. Las diferencias significativas se indican con asterisco (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Solo se muestran las diferencias dentro de cada tiempo.

Cuantificación de DWV

En cuanto al virus de las alas deformes, en todos los casos se obtuvieron cargas virales muy altas, siendo el CT promedio por grupo menor a 13 (Figura 19, Tabla 3). No se observaron diferencias significativas en la carga viral entre los distintos grupos (Kruskal-Wallis test $p = 0.95$).

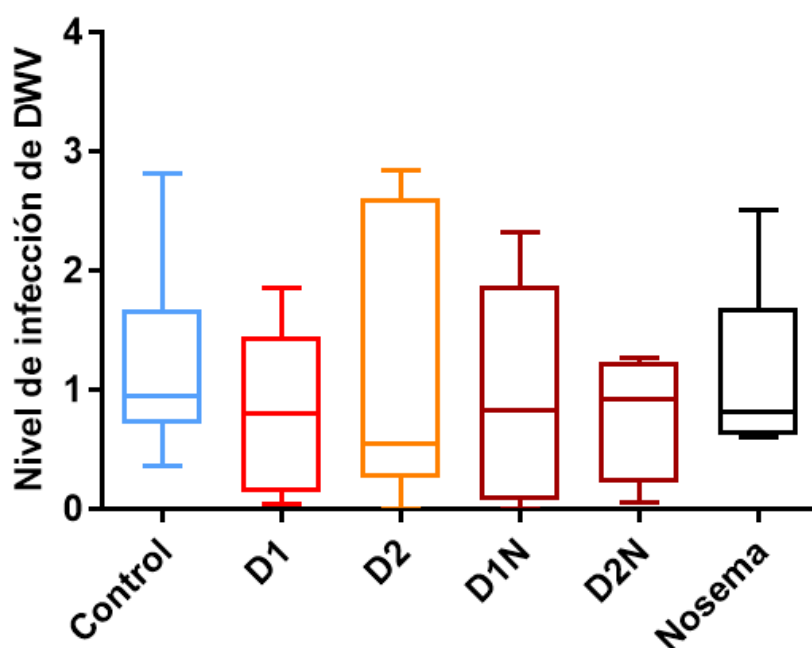


Figura 19.- Efecto de la administración del EEP en el nivel de infección del DWV, en abejas naturalmente infestadas con *V. destructor* y DWV. Los grupos D1 y D2 recibieron EEP en dosis 0,5 y 2%, respectivamente, mientras que los grupos D1N y D2N recibieron EEP y se infectaron con esporas de *N. ceranae*. El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe y el grupo N corresponde al control de infección, que recibió esporas. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 3.- Valores del Ct de los experimentos con abejas sanas o con síntomas del DWV.

DWV		Ensayo abejas sanas	Ensayo abejas con síntomas de DWV
Control	Promedio +/- Desvest	34,49	9.87 +/- 1.05
D1	Promedio +/- Desvest	34,57 +/- 0,12	11.72 +/- 2.23
D2	Promedio +/- Desvest	32,09 +/- 4,18	12.31 +/- 5.05
D1N	Promedio +/- Desvest	33,52 +/- 0,42	12.22 +/- 4.08
D2N	Promedio +/- Desvest	32,58 +/- 1,66	11.82 +/- 2.93
Nosema	Promedio +/- Desvest	33,26 +/- 1,52	10.54 +/- 0.88

Expresión de genes vinculados a la inmunidad

La administración del EEP aumentó la expresión del gen que codifica para la glucosa oxidasa en los individuos inoculados con esporas de *N. ceranae*, respecto al grupo control, y al grupo solo inoculado con el microsporidio (Figura 20, Kruskal-Wallis, $p > 0.03$; Mann-Whitney, D1N vs N, $p = 0.04$; D2N vs N, $p = 0.002$; D2N vs C, $p = 0.008$).

La infección por *N. ceranae* no modificó la expresión de este gen (Mann-Whitney, C vs N $p = 0.23$).

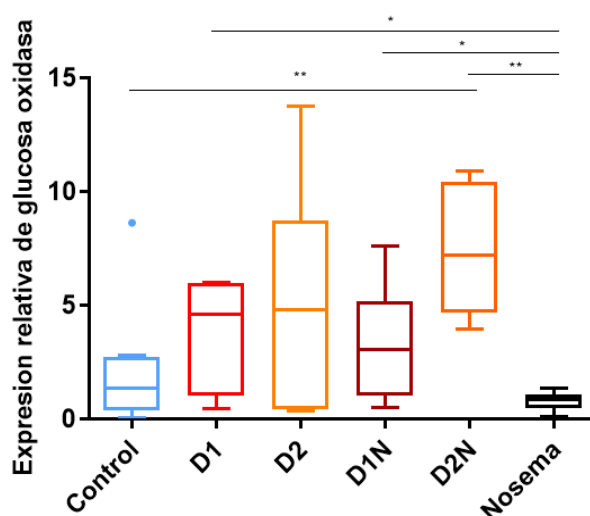


Figura 20.- Expresión del gen que codifica para la glucosa oxidasa en abejas con *V. destructor* y DWV, alimentadas con jarabe suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección. Las diferencias significativas se indican con una barra y un asterisco (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Por otra parte, se observó que su administración no modificó la expresión de la vitelogenina ni de la himenoptecina (Kruskal-Wallis test $p > 0,05$) (Figura 21).

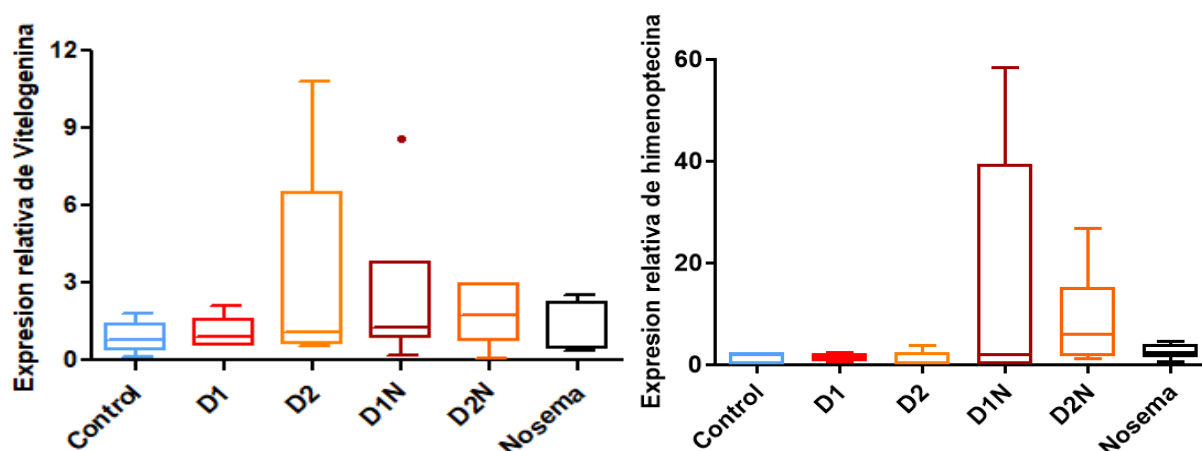


Figura 21.- Expresión de genes que codifican para vitelogenina e himenoptecina en abejas con *V. destructor* y DWV, alimentadas con jarabe suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

La infección por *N. ceranae* disminuyó significativamente la supervivencia de las abejas (Figura 22, Log Rank N vs C; $p < 0,0001$). La administración de EEP (D1) redujo significativamente la mortalidad causada por este microsporidio, siendo similar al grupo control (Log Rank N vs D1N $p < 0,0001$; C vs D1N $p = 0.7545$). Al igual que en el ensayo anterior, se observó una disminución significativa en la vida media de las abejas melíferas en aquellos grupos que consumieron el EEP en D2 (Log Rank D2 vs C $p < 0,0001$; D2N vs C $p < 0,0001$).

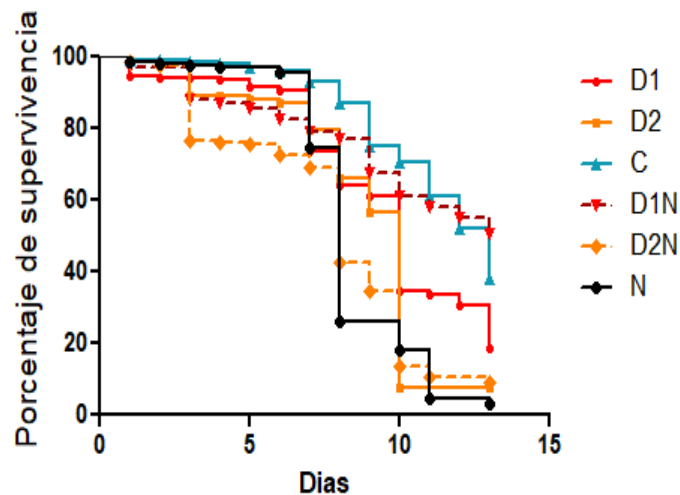


Figura 22.- Supervivencia de abejas melíferas con *V. destructor* y DWV alimentadas con jarabe de sacarosa suplementado con EEP en dosis 0,5, 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección.

Por último, se observó que el consumo de jarabe de sacarosa fue similar entre todos los grupos (Figura 23, Kruskal-Wallis $p=0.25$).

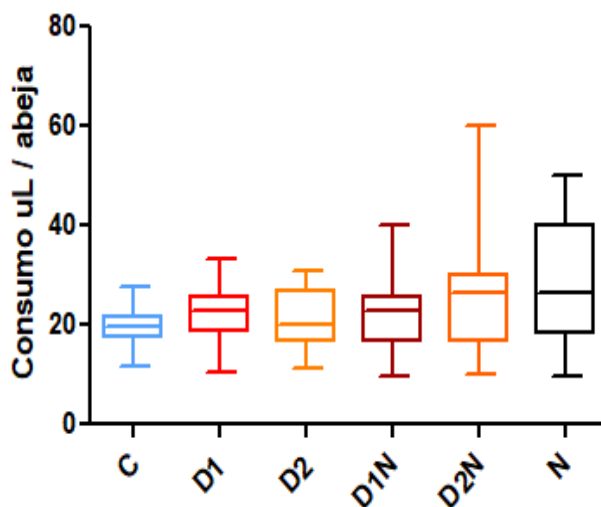


Figura 23.- Consumo de jarabe en abejas con *V. destructor* y DWV que recibieron alimento suplementado con EEP en dosis 0,5 y 2% (D1 y D2) o suplementadas con EEP e inoculadas con esporas de *N. ceranae* (D1N y D2N). El grupo C corresponde al control, que recibió sólo jarabe. El grupo N corresponde al control de infección. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Discusión

En esta tesis se evaluó la administración de EEP como estrategia para mejorar la salud de las abejas. Este primer capítulo se centró en el estudio de su efecto en la infección por los patógenos *N. ceranae* y DWV, así como en la respuesta inmune de la abeja, a nivel individual, empleando abejas criadas en condiciones de laboratorio.

La administración diaria de jarabe suplementado con EPP en diferentes dosis, así como la administración una vez por semana en dosis alta (5%) resultó tóxica. En esta línea, estudios previos realizados por Damiani *et al.* (2010) reportaron que la administración oral de jarabe de sacarosa suplementado con EEP al 20%, causa un 25% de mortalidad de las abejas después de 72 h. Por otro lado, su administración en forma de “candy” (10%) no afectó la supervivencia de las abejas, pero produjo efectos sub-letales. Se observó que la dieta con propóleos afecta los cuerpos grasos, disminuyendo su masa en abejas de invierno y aumentándola en abejas de verano. A la vez, se observó una disminución en el tamaño de las glándulas hipofaríngeas (Damiani *et al.*, 2017a).

En contraste a estas observaciones, otros autores no encontraron efectos adversos del EEP en la supervivencia de las abejas al evaluar concentraciones de propóleos al 50 y 70%, durante 30 días (Suwannapong *et al.*, 2018; Yemor *et al.*, 2015). A la vez, Arismendi *et al.* (2018) evaluando 2 extractos de propóleos de diferentes zonas en concentraciones de 2, 4, 8 y 16%, observaron que la supervivencia fue superior al 70% en 21 días.

La toxicidad observada por parte de algunos extractos de propóleos podría deberse a la concentración de compuestos químicos que lo componen, que varía en base a la vegetación que le dio origen (Bankova *et al.*, 2019). En esta línea, Johnson *et al.*, (2012) encontraron que la administración de EEP generó una expresión elevada de tres genes del citocromo P450 implicados en la desintoxicación de insecticidas, sugiriendo que el propóleos estimularía la desintoxicación.

En base a estos hallazgos, se sugiere seleccionar cuidadosamente el extracto de propóleos a emplear, así como las dosis y frecuencias de aplicación, con el fin de evitar efectos no deseados.

Por otro lado, la mortalidad observada en nuestros ensayos podría estar vinculada al uso exclusivo de jarabe de azúcar como alimento, en lugar de emplear jarabe y polen, lo que mejora la sobrevivencia de las abejas (Arismendi *et al.*, 2018; Crailsheim *et al.*, 1992; Porrini *et al.*, 2015; Suwannapong *et al.*, 2018; Yemor *et al.*, 2015). Dado que los resultados pueden variar de acuerdo al polen que se utiliza (polifloral/monofloral, esterilizado o no, Castelli *et al.*, 2020), en los ensayos que forman parte de esta tesis se decidió no utilizar polen para no agregar un factor de confusión.

La administración de EEP en jarabe no afectó el consumo de alimento, por lo que, a pesar que en la naturaleza las abejas no ingieren el propóleo de forma oral, no se observó un efecto repelente. Esto coincide con lo reportado por Arismendi *et al.*, (2018), Burnham *et al.*, (2020) y Mura *et al.*, (2020). El promedio de consumo por abeja (20 μ l) fue similar a lo observado en estudios previos en condiciones similares (Balbuena *et al.*, 2022; Castelli *et al.*, 2021).

El EEP fue capaz de disminuir el nivel de infección por *N. ceranae* en abejas infectadas experimentalmente. En abejas co-infectadas por *V. destructor*, DWV y *N. ceranae* se obtuvieron resultados similares, aunque como estas abejas tuvieron una alta mortalidad, el número de individuos colectados en el último muestreo fue bajo, por lo tanto, en algunas comparaciones solo se observa una tendencia. El uso de EEP para disminuir la infección por *N. ceranae* había sido previamente reportado en ensayos de laboratorio empleando diferentes especies de abejas, incluyendo *Apis florea* (Suwannapong *et al.*, 2011, 2018), *Apis cerana* (Yemor *et al.*, 2015) y *Apis mellifera* (Arismendi *et al.*, 2018; Naree *et al.*, 2021).

La forma de acción del EEP sobre *N. ceranae* aún no se ha dilucidado. Podría deberse a una acción directa antimicrobiana de algún componente del propóleo, como los flavonoides, terpenoides, fenólicos entre otras moléculas aromáticas (Toreti *et al.*, 2013). Se ha reportado que el ácido caféico (un ácido fenólico) y la pinocembrina (un flavonoide) inhiben el crecimiento de hongos (Toreti *et al.*, 2013), por lo que podrían estar vinculados a la inhibición de *N. ceranae*. La actividad también podría deberse a una interacción sinérgica entre la variedad de compuestos que se recogen de las secreciones de distintas plantas (Almuhayawi., 2020). Burnham *et al.*, (2020) estudiaron el efecto directo del EEP sobre las esporas de *N. ceranae*, y observaron que estas no fueron

afectadas, sugiriendo que el intestino de la abeja es necesario para la actividad antimicrobiana del EEP.

Por otro lado, la reducción en el número de esporas de *N. ceranae* podría deberse a un efecto indirecto del EEP, mediante la activación del sistema inmune de las abejas. Un sello distintivo de la respuesta inmune de los insectos es la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMP) (Lemaitre y Hoffmann 2007), que pueden eliminar a los microorganismos invasores (Zaslloff 2002). Las vías Toll e Imd son los reguladores principales de la expresión inducible de una batería de genes que codifican AMP, como apidaecina, abaecina, defensina-1, defensina-2, himenoptaecina o apisimina (Evans *et al.* 2006). Se ha reportado que la ingesta de EEP puede modular la expresión de varios genes, incluyendo la himenoptecina, glucosa oxidasa, abaecina, defensina y citocromo P450s (Johnson *et al.*, 2012; Simone *et al.*, 2009, 2017). Coincidiendo con estos estudios, en este trabajo se observó que en abejas sanas infectadas artificialmente con *N. ceranae*, el EEP es capaz de aumentar la expresión de himenoptecina, lo que podría estimular la destrucción de las esporas. A la vez, en abejas co-infectadas por *N. ceranae*, *V. destructor* y DWV, el EEP aumentó la expresión de glucosa oxidasa. Esta enzima, producida por las glándulas hipofaríngeas y liberada a la miel y a la jalea real (Sano *et al.*, 2003; Brudzynski, 2011), convierte la β -D-glucosa en ácido D-glucónico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a través de una reacción de oxidación (Ohashi *et al.*, 1999). El H₂O₂ inhibe el crecimiento de bacterias y hongos en la miel y jalea real, generalmente usadas como alimento de las larvas (Ohashi *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 2003), por lo que se lo considera un marcador de inmunidad social (Evans y Spivak, 2010). Los resultados obtenidos sugieren que el EEP también estaría reforzando este mecanismo, como forma de evitar la infección de la cría.

En líneas generales, el EEP es capaz de modular el sistema inmune de la abeja, estimulando la respuesta a nivel individual (a través de la himenoptecina) y social (a través de la glucosa oxidasa).

Finalmente, la administración de EEP no afectó la multiplicación del virus DWV. A pesar de las actividades antivirales descritas para el propóleo (Simone *et al.*, 2010, Silva-Carvalho *et al.*, 2015), no ha sido efectivo para el control de virus de las abejas (Borba *et al.* 2015; Simone *et al.*, 2017). Borba *et al.* (2015) no encontraron diferencias en las cargas virales del DWV, virus de las células reales negras (BQCV) o el virus de la

parálisis aguda (ABPV) en colmenas que colectaron distintas cantidades de propóleos en otoño o primavera.

Curiosamente, en abejas con bajo nivel de infección por DWV, este nivel se vio afectado por la infección con *N. ceranae*, mientras que en abejas con altas cargas de DWV no se observó esta interacción. La interacción entre estos dos patógenos ha sido ampliamente estudiada, aunque los resultados no son concluyentes. Algunos investigadores han propuesto que *N. ceranae* podría acelerar la replicación de DWV en las primeras etapas de la infección (Zheng *et al.*, 2015; Balbuena *et al.*, 2022), mientras que otros autores observaron una interacción negativa dentro del huésped (Doublet *et al.*, 2015).

Capítulo 2: Efecto de la administración del EEP en colmenas de producción

En el primer capítulo de esta tesis se observó que la administración del EEP disminuye la multiplicación de las esporas de *N. ceranae* en abejas infectadas en condiciones de laboratorio, además de estimular la expresión de algunos genes vinculados al sistema inmune de las abejas (*himenoptecina* y *glucosa oxidasa*).

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación, revelaron que la administración oral de EEP en condiciones de campo en colmenas naturalmente infectadas con *P. larvae*, logró disminuir su nivel de infección (Antúnez *et al.*, 2008). Sin embargo, no existen hasta el momento, estudios de campo que evalúen su efectividad contra otros patógenos, como *N. ceranae*.

Las colmenas de abejas melíferas constituyen un sistema complejo, con defensas tanto individuales como sociales con el fin de mantener la salud general de la colmena (Gómez-Moracho *et al.*, 2017). Es por esta razón, que los beneficios observados a nivel individual pueden no extrapolarse a nivel de la colmena (Alberoni *et al.*, 2016; Evans, 2006; Pritchard, 2016; Simone *et al.*, 2009).

En base a estos antecedentes, en este capítulo se profundizó en el estudio del impacto de la administración oral del EEP en las abejas a nivel colonial.

Materiales y Métodos

- Ensayo de campo:

El ensayo de campo se realizó en colmenas de producción localizadas en 25 de mayo, en el departamento de Florida, Uruguay (80 km de la ruta 5, 25km ruta 76).

Se realizó un muestreo previo de abejas nodrizas y pecoreadoras de cada colmena para determinar el nivel de infección con *N. ceranae* y *V. destructor* (abril de 2019). En base al número de esporas de *N. ceranae* por colmena, el apiario se dividió en tres grupos homogéneos de 12 colmenas cada uno. Se tomó en consideración el nivel de infestación de *V. destructor* ya que altos niveles de parasitación con este ácaro pueden ser letales para la colmena (Human *et al.*, 2013). Para evitar esto, las colmenas se trataron con acaricida al comenzar con los ensayos (tiras de ácido oxálico comerciales).

El primer grupo recibió jarabe 1:1 (1kg de azúcar en 1L de agua) suplementado con EEP a una concentración final de 2%, mediante asperjado en cada cuadro (50 mL) y en alimentador (500 mL). Un segundo grupo se utilizó como control del vehículo, y recibió jarabe 1:1 mediante asperjado en cada cuadro (50 mL) y en alimentador (500 mL) y el grupo Control no recibió tratamiento.

Los tres tratamientos se realizaron una vez a la semana, durante 3 semanas consecutivas después de la última cosecha (mayo de 2019).

El día de la primera aplicación del EEP, al mes y a los tres meses se evaluaron diferentes parámetros de fortaleza de la colmena y se colectaron muestras de abejas para su posterior análisis. Se tomaron muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras y se almacenaron en alcohol 70% para el análisis del nivel de parasitación con *V. destructor* y *Nosema* spp., respectivamente. Se consideraron abejas nodrizas aquellas abejas tomadas cerca del nido de cría y pecoreadoras las abejas del interior pero ubicadas lejos del nido de cría (Fries *et al.*, 2013).

- Fortaleza de la colmena

La fortaleza de la colmena se estimó mediante inspección visual, de acuerdo a lo recomendado por Delaplane *et al.* (2013). El encargado de estas observaciones fue un técnico de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, MGAP) con amplia trayectoria en apicultura. Se estimó la cantidad de población (adulta y cría), la calidad de la cría, las reservas de miel y polen. La población de abejas adultas y reservas de miel se registraron como número de cuadros cubiertos. La cantidad de cría se midió como cuarto de cuadro cubierto. Posteriormente todos estos datos se transformaron a cm2 de acuerdo a lo descrito en el manual del COLOSS Beebook (Delaplane *et al.*, 2013).

- Cuantificación de *Varroa destructor*:

Para la cuantificación de *V. destructor* se utilizaron las muestras de abejas nodrizas conservadas en alcohol 70%. Se agitó la muestra de abejas nodrizas en agua tibia y detergente durante 1 minuto para provocar el desprendimiento de los ácaros adheridos ("Varroacheck", Véto-pharma). Posteriormente se realizó el recuento de abejas y de ácaros. El nivel de infestación se obtuvo del cociente entre el número de ácaros obtenidos y el número de abejas analizadas, multiplicado por cien (Dietemann *et al.*, 2013).

- Cuantificación de *Nosema spp*:

La cuantificación de esporas de *Nosema spp.* se realizó utilizando las muestras de abejas pecoreadoras conservadas en alcohol 70%. En primer lugar se diseccionaron 60 abdómenes y se homogeneizaron en 60 mL de agua (destilada y esterilizada) durante 2 min a máxima velocidad en un homogeneizador Stomacher 80 LabBlender (Seward). Luego se colocaron 10 µL del homogeneizado en una cámara de Neubauer (improved) y se observaron en microscopio óptico a 400x de acuerdo a lo descrito en el manual del COLOSS Beebook (Fries *et al.*, 2013).

Se determinó el número de esporas de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ esporas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Área de los cuadrados contados} \times \text{Profundidad de la cámara}}$$

(Human *et al.*, 2013)

- **Análisis estadístico**

El impacto de la administración de EEP en los parámetros estudiados se analizó mediante el test estadístico ANOVA y prueba de Tukey cuando los datos se ajustaban a los supuestos de la estadística paramétrica o pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney en los casos que no.

En todos los casos, los valores de p inferiores o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y valores de p menores a 0,1 se consideraron tendencias. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphpadPrism versión 8.

Resultados

Fortaleza de la colmena

Al inicio del ensayo (mayo), las colonias de los diferentes grupos presentaron similar población de abejas adultas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). En el mes de junio, se observó que en las colmenas del grupo EEP, presentaron una tendencia a mantener más numerosa la población que las colmenas del grupo control y vehículo (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$; Mann-Whitney, EEP vs Control J, $p = 0,09$; EEP vs Vehículo J, $p = 0,07$).

A su vez, se observó una disminución significativa de la población de julio a agosto, conforme al transcurso del invierno (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$; Mann-Whitney, $p < 0,01$ en cada grupo) (Figura 25a).

La cantidad de cría fue homogénea entre los tratamientos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$ en todos los meses). El grupo control se mantuvo estable a lo largo del ensayo. La cantidad de cría aumentó de mayo a junio en el grupo EEP (Mann-Whitney, EEP M vs EEP J $p = 0,01$) y disminuyó significativamente de junio a agosto (Mann-Whitney, EEP J vs EEP A, $p = 0,01$) (Figura 25b). El grupo Vehículo se comportó de forma similar al grupo EEP.

La cantidad de miel fue similar entre los diferentes grupos en los distintos tiempos.

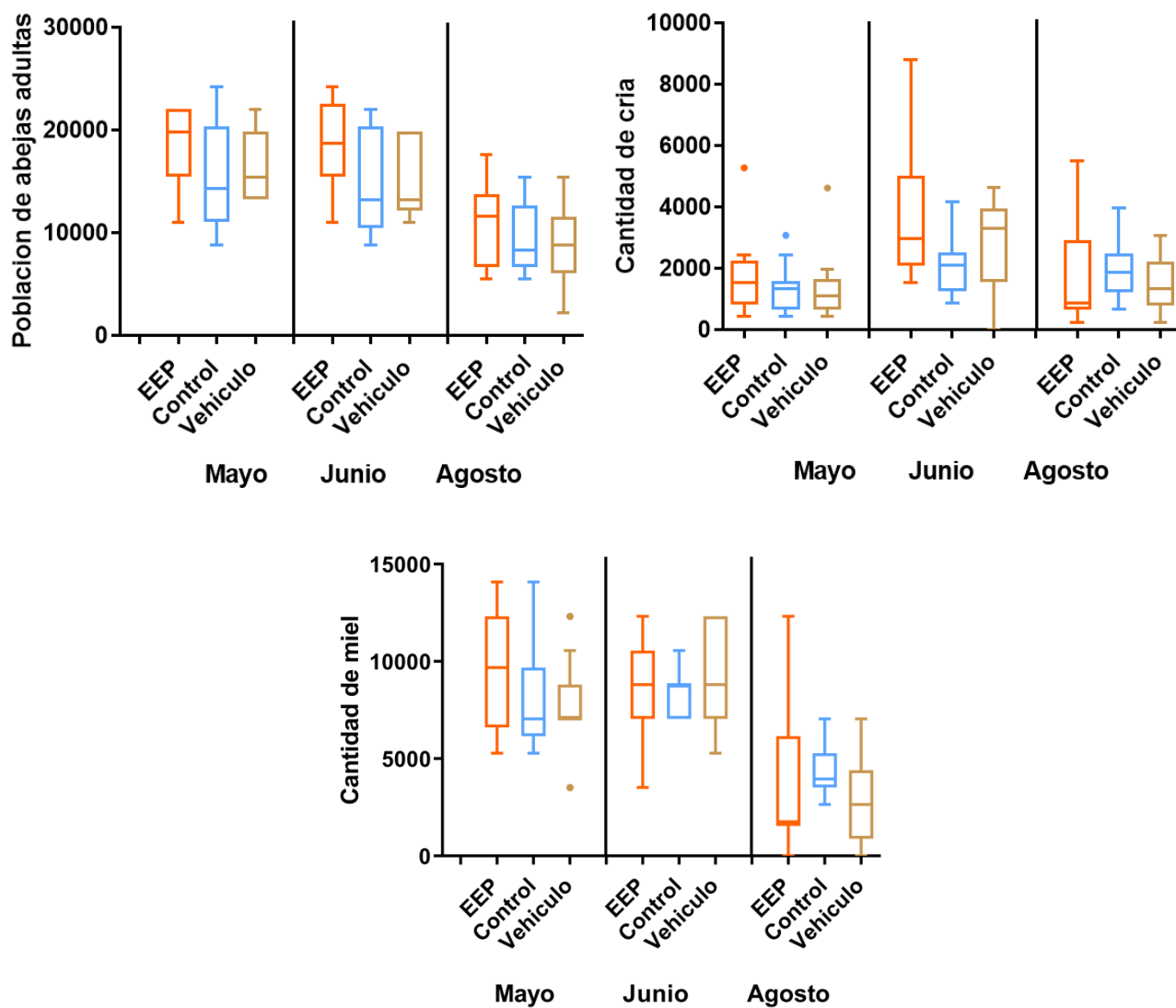


Figura 25.- Efecto de la administración del EEP en la fortaleza de las colmenas. a- Población de abejas adultas (cm2), b- Población de cría (cm2) y c- Cantidad de miel (cm2) en función de los meses, otoño 2019. Los resultados se muestran como box-plots, indicando las colmenas tratadas con EEP en naranja, con vehículo en marrón y control en celeste.

Estado sanitario de las colmenas

La aplicación del acaricida orgánico en las colmenas, permitió comenzar el ensayo con niveles de *Varroa destructor* bajos y homogéneos. El porcentaje de infestación se mantuvo bajo en todos los grupos y durante todo el experimento (Figura 26). A pesar de no observar diferencias significativas (Kruskal-Wallis test, $p > 0,05$), el nivel de infestación en las colmenas tratadas con EEP fue menor en todos los meses.

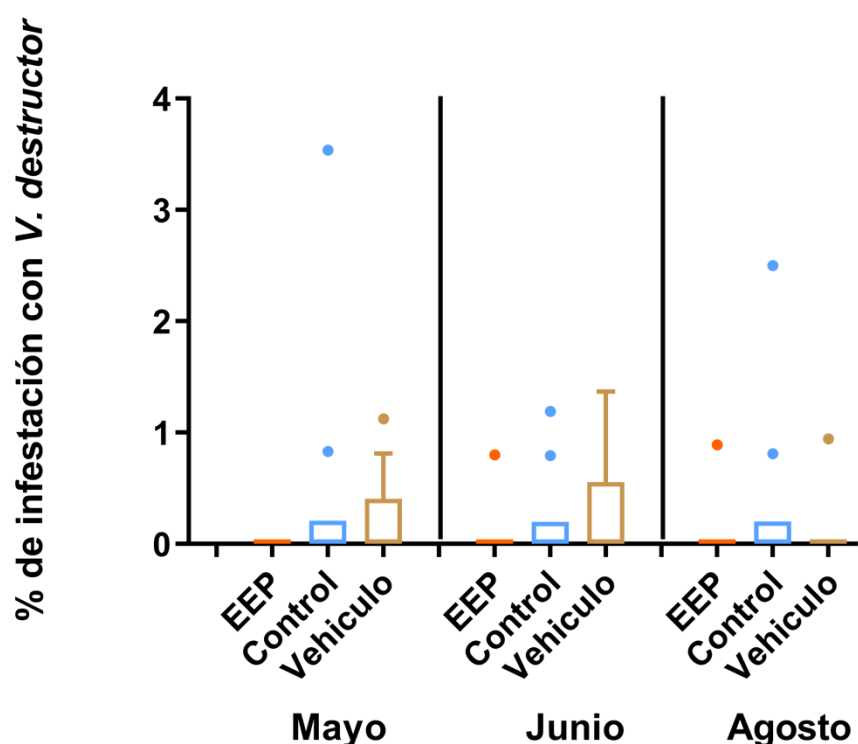


Figura (26).- Nivel de infestación con *V. destructor* en función de los meses, otoño 2019. Los resultados se muestran como box-plots, indicando las colmenas tratadas con EEP en naranja, con vehículo en marrón y control en celeste. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

En cuanto al número de esporas de *N. ceranae* en las colmenas, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, ni dentro de los mismos a lo largo de los meses estudiados (Figura 27, Kruskal-Wallis test, $p > 0,05$).

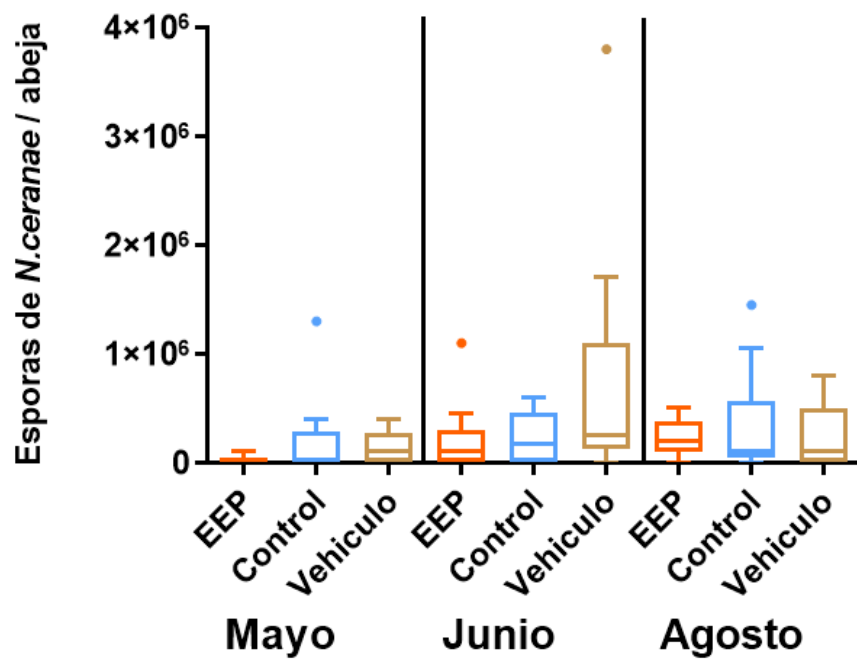


Figura (27).- Número de esporas de *N. ceranae* en función de los meses, otoño 2019. Los resultados se muestran como box-plots, indicando las colmenas tratadas con EEP en naranja, con vehículo en marrón y control en celeste. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Discusión

Se ha observado que las colmenas de abejas africanizadas son capaces de coleccionar grandes cantidades de propóleos (Manrique y Soares, 2002). Las colmenas que coleccionan mayor cantidad tienen mayor tasa de supervivencia de la cría y mayor longevidad de las abejas (Borba, 2015), mayor comportamiento higiénico y más reservas de polen y miel (García *et al.*, 2013; Manrique y Soares, 2002; Nicodemo *et al.*, 2013; Padilha *et al.*, 2013). Incluso, se ha propuesto que la colecta de propóleos puede ser una forma de automedicación (Simone y Spivak, 2012). Como ejemplo, cuando las colmenas están infectadas con el hongo *Ascophaera apis* (causante de la enfermedad de la cría yesificada) aumentan las tasas de búsqueda de resinas (Simone y Spivak, 2012).

En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se observó que la administración de EEP mediante asperjado y en alimentador en colmenas naturalmente infectadas con *Paenibacillus larvae*, es capaz de disminuir el nivel de esporas en miel, encontrando una forma natural de combatir y prevenir este patógeno (Antúnez *et al.*, 2008).

En cuanto a los efectos del propóleos sobre *V. destructor*, en estudios realizados a nivel de laboratorio se encontró que la exposición directa puede provocar efectos narcóticos que reducen las tasas metabólicas y la producción de calor, debilitando su movilidad, y disminuyendo su capacidad de lidiar con los factores ambientales estresantes (Garedew *et al.*, 2002, 2004). Finalmente, puede causar una alta mortalidad del ácaro (Damiani *et al.*, 2010, 2015; Garedew *et al.*, 2002, 2004, Pusceddu *et al.*, 2019).

Estos antecedentes, sumados a los hallazgos reportados en el primer capítulo de esta tesis referidos a la capacidad del EEP de disminuir la infección por *N. ceranae* y estimular la respuesta inmune de la abeja, motivaron profundizar en el estudio del efecto del EEP en condiciones de campo.

Sin embargo, en las condiciones de este ensayo, la administración de EEP por asperjado y alimentador en colmenas de producción no generó una mejora en la fortaleza de la colmena ni una disminución en el nivel de parasitación por *V. destructor* o *N. ceranae*.

Este resultado puede deberse a que las colmenas presentaron un bajo nivel de infección por *N. ceranae*, y no fue suficiente para evidenciar un efecto. En estudios

previos observamos que el nivel de infección aumenta en invierno, cuando gran parte de la población se encuentra confinada en la colmena y se favorece la dispersión del microsporidio entre individuos (Antunez *et al.*, 2015). Sin embargo, en el año 2019 no se observó este aumento. No se puede descartar que la administración del EEP presente un efecto sobre *N. ceranae* en colmenas con un mayor número de esporas.

Por otro lado, en el caso de *V. destructor* tampoco se observó un efecto, ya que las colmenas presentaron bajos niveles de infestación (menores al 1%). Por ser colmenas de producción, pertenecientes a un apicultor, todas las colmenas recibieron tratamiento con acaricida orgánico antes del inicio del ensayo. Sería interesante poder utilizar colmenas sin tratar con acaricidas para observar el efecto directo del EEP sobre el ácaro.

Finalmente, tampoco se encontró una mejora en la fortaleza de las colmenas. El ensayo fue realizado entre mayo y agosto, cuando las colmenas se encuentran sin movimiento, sin flujo de néctar, por lo tanto, al estudiar los parámetros de fortaleza se observa que la cantidad de abejas adultas y cría tienden a mantenerse y la cantidad de miel decrece por el consumo.

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman parcialmente la hipótesis planteada. La administración del EEP tiene el potencial de disminuir el número de esporas de *N. ceranae* y es capaz de modular el sistema inmune de la abeja, aumentando la expresión de la Hymenoptecina y Glucosa oxidasa en condiciones de laboratorio. Sin embargo, a nivel de campo no se observaron efectos sobre la fortaleza de la colmena, su estado sanitario o la producción de miel. Estos ensayos deberían repetirse en distintas condiciones para poder evaluar otros posibles escenarios.

Conclusiones generales

- El EEP puede contener componentes que resulten tóxicos para las abejas, por lo que es necesario testear que las dosis y frecuencia de administración sean seguras.
- La administración del EEP es capaz de disminuir el número de esporas de *N. ceranae* en abejas experimentalmente infectadas en condiciones de laboratorio.
- El EEP aumenta la expresión de genes vinculados a la inmunidad de la abeja, como el péptido antimicrobiano *himenoptecina* y el marcador de inmunidad social *glucosa oxidasa*. Esto podría explicar la disminución en el nivel de infección por *N. ceranae*.
- En condiciones de campo, la administración del EEP al 2% (en alimentador y por asperjado) no tuvo efecto en la fortaleza ni salud de la colmena.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren diversas perspectivas en el campo del uso del propóleo para mejorar la salud de las abejas melíferas.

Se debería profundizar en la evaluación de otras frecuencias y duración de las aplicaciones del EEP, por ejemplo, 3 aplicaciones cada 2 semanas. Esto podría dar mayor flexibilidad al apicultor para el manejo de sus apiarios.

Sería interesante también evaluar la predilección de las abejas por el alimento. El propóleo no es consumido por las abejas, planteamos la hipótesis de que pueden elegir ingerirlo cuando son desafiadas por un patógeno, como una forma de medicación. Para este ensayo se pondrían dos jeringas en la jaula (una con jarabe y la segunda con jarabe + EEP) y se mediría el consumo de los alimentos.

Por otra parte, se podría estudiar la expresión de genes vinculados a la inmunidad a diferentes tiempos luego de consumir el EEP. Esto resulta interesante, ya que nos permitiría observar cómo se da la regulación de la expresión de estos genes luego de ser estimulados. Además, agregaría al estudio los genes que codifican para el Citocromo P450, indicador de intoxicación, de forma de evaluar si las dosis administradas resultan tóxicas.

Por último, a nivel de campo se podría estudiar la aplicación del EEP en la temporada de primavera, para evaluar si puede estimular el desarrollo temprano de la colmena. También sería interesante estudiar el efecto del EEP en colmenas con mayor carga de patógenos (*N.ceranae* y *V. destructor*)

Referencias

- Abrol, D. P. (2011). Pollination Biology: Biodiversity conservation and agricultural production. In *Pollination Biology: Biodiversity Conservation and Agricultural Production* (Issue 1). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1942-2>
- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., y Di Gioia, D. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), 9469–9482. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7870-4>
- Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi journal of biological sciences*, 27(11), 3079–3086.
- Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., y Omholt, S. W. (2004). Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering? *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 1086–1095. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2004\)097](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2004)097)
- Amiri, E., Meixner, M., Nielsen, S. L., y Kryger, P. (2015). Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *PLOS ONE*, 10(10), e0140272. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0140272>
- Anderson, D. L., y Giacon, H. (1992). Reduced Pollen Collection by Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies Infected with *Nosema apis* and Sacbrood Virus. *Journal of Economic Entomology*, 85(1), 47–51. <https://doi.org/10.1093/JEE/85.1.47>
- Anderson, D. L., y Gibbs, A. J. (1988). Inapparent Virus Infections and their Interactions in Pupae of the Honey Bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *Journal of General Virology*, 69(7), 1617–1625. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1617>
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P., y Antúnez, K. (2015). Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 54(5). <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1175731>
- Annoscia, D., Brown, S. P., Prisco, G. Di, Paoli, E. De, Fabbro, S. Del, Frizzera, D., Zanni, V., Galbraith, D. A., Caprio, E., Grozinger, C. M., Pennacchio, F., y Nazzi, F. (2019). Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1901). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2019.0331>
- Antúnez, K., Alessandro, B. D., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., y Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.009>
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., y Zunino, P. (2012). *American Foulbrood in Uruguay : Twelve years from its first report*. 110, 129–131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.008>

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., y Zunino, P. (2005). Detection of Chronic bee paralysis virus and Acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.07.001>

Antúnez, K., Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M., y Zunino, P. (2008). Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology*, 131(3–4), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.011>

Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Zunino, P. (2015). Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*, 70(2), 522–533. doi:10.1007/s00248-015-0594-7

Araújo, J. P. M., y Hughes, D. P. (2016). Diversity of Entomopathogenic Fungi. Which Groups Conquered the Insect Body? *Advances in Genetics*, 94, 1–39. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>

Arbulo, N., Antúnez, K., Salvarrey, S., Santos, E., Branchiccela, B., Martín-Hernández, R., Higes, M., y Invernizzi, C. (2015). High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 165–168. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.07.018>

Arismendi, N., Vargas, M., López, M. D., Barría, Y., y Zapata, N. (2018). Promising antimicrobial activity against the honey bee parasite *Nosema ceranae* by methanolic extracts from Chilean native plants and propolis. *Journal of Apicultural Research*, 57(4), 522–535. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1453006>

Bailey, L. (2003). Honey Bee Pathology. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.En.13.010168.001203>, 13(1), 191–212. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.EN.13.010168.001203>

Bailey, L., y Fernando, E. F. W. (1972). Effects of sacbrood virus on adult honeybees. *Annals of Applied Biology*, 72(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1972.tb01268.x>

Bailey, L., Gibbs, A. J., y Woods, R. D. (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 21(3), 390–395. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(63\)90200-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(63)90200-9)

Bailey, L., Gibbs, A. J., y Woods, R. D. (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 23(3), 425–429. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(64\)90266-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90266-1)

Bailey, L., Gibbs, A. J., y Woods, R. D. (1967). The purification and properties of phosphotransacetylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 196(2), 527–534. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52386-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52386-9)

Baker, A., y Schroeder, D. (2008). Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2), 239–242. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2008.02.010>

Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin, M. N., I Falcão, S., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K. B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., ... Zampini, C. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1–49.

<https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661>

Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., De Miranda, J. R., y Dalmon, A. (2020). Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. In *Insects* (Vol. 11, Issue 4, pp. 1–25). <https://doi.org/10.3390/insects11040239>

Benaets, K., Van Geystelen, A., Cardoen, D., De Smet, L., De Graaf, D. C., Schoofs, L., Larmuseau, M. H. D., Brettell, L. E., Martin, S. J., y Wenseleers, T. (2017). Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1848). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2149>

Boecking, O., y Genersch, E. (2008). Varroosis - The ongoing crisis in bee keeping. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 3(2), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s00003-008-0331-y>

Boncrisiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J. D., Pettis, J., y Vanengelsdorp, D. (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 58(5), 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.011>

Borba, R. S. (2015). Constitutive and therapeutic benefits of plant resins and a propolis envelope to honey bee, *Apis mellifera* L., immunity and health. *PhD Dissertation*, 13(3), 1–112. <http://hdl.handle.net/11299/175707>

Borba, R. S., Klyczek, K. K., Mogen, K. L., y Spivak, M. (2015). *Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health*. 3689–3699. <https://doi.org/10.1242/jeb.127324>

Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Invernizzi, C., y De, G. M. (2019). *Impact of nutritional stress on the honeybee colony health*. June, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46453-9>

Brudzynski, K. (2011). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. <https://doi.org/10.1139/W06-086>, 52(12), 1228–1237. <https://doi.org/10.1139/W06-086>

Burnham, A. J., De Jong, E., Jones, J. A., y Lehman, H. K. (2020). North American Propolis Extracts From Upstate New York Decrease *Nosema ceranae* (Microsporidia) Spore Levels in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01719>

Campá, J., y Harriet, J. (2007). *Pautas sanitarias para manejar correctamente la varroasis*.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., y Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044–7054. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53143-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53143-4)

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., y Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387–2391. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1989.TB08368.X>

CASTEELS, P., AMPE, C., RIVIERE, L., DAMME, J. van, ELICONE, C., FLEMING, M., JACOBS, F., y TEMPST, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 381–386. <https://doi.org/10.1111/J.1432->

1033.1990.TB15315.X

Castelli, L., Branchiccela, B., Garrido, M. *et al.* Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and Nosema ceranae Infection. *Microb Ecol* 80, 908–919 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01538-1>

Castelli, L., Balbuena, S., Branchiccela, B., Zunino, P., Liberti, J., Engel, P., & Antúñez, K. (2021). Impact of chronic exposure to sublethal doses of glyphosate on honey bee immunity, gut microbiota and infection by pathogens. *Microorganisms*, 9(4), 845.

Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R., y de Graaf, D. C. (2017). Nosema neumanni n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, Apis mellifera in Uganda. *European Journal of Protistology*, 61, 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.EJOP.2017.07.002>

Chen, Y.-P., y Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. 70(07), 309–323. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/rwvi.1999.0139>

Chen, Y. P., y Huang, Z. Y. (2010). Nosema ceranae, a newly identified pathogen of Apis mellifera in the USA and Asia*. *Apidologie*, 41, 364–374. <https://doi.org/10.1051/apido/2010021>

Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., y Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7128–7133. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0701909104>

Crailsheim, K., y Riessberger-Gallé, U. (2001). Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*, 32(1), 91–103. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2001114>

Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., y Schöffmann, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (Apis mellifera carnica): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, 38(6), 409–419. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(92\)90117-V](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90117-V)

Crane, E. (1999). Recent research on the world history of beekeeping. *Bee World*, 80(4), 174–186. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099453>

Cremer, S., Armitage, S. A. O., y Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16), R693–R702. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2007.06.008>

Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J., y Moury, B. (2017). Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep41045>

Damiani, N., Fernández, N. J., Maldonado, L. M., Álvarez, A. R., Eguaras, M. J., y Marcangeli, J. A. (2010). Bioactivity of propolis from different geographical origins on Varroa destructor (Acari: Varroidae). *Parasitology Research* 2010 107:1, 107(1), 31–37. <https://doi.org/10.1007/S00436-010-1829-7>

Damiani, N., Maggi, M. D., Gende, L. B., Faverin, C., Eguaras, M. J., y Marcangeli, J. A. (2015). Evaluation of the toxicity of a propolis extract on Varroa destructor (Acari: Varroidae) and Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae).

[Http://Dx.Doi.Org/10.3896/IBRA.1.49.3.05](http://Dx.Doi.Org/10.3896/IBRA.1.49.3.05), 49(3), 257–264. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.3.05>

Damiani, N., Porrini, M. P., Lancia, J. P., Álvarez, E., Garrido, P. M., Domínguez,

- E., Gende, L. B., y Eguaras, M. J. (2017a). Effect of propolis oral intake on physiological condition of young worker honey bees, *apis mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*, 61(2), 193–202. <https://doi.org/10.1515/JAS-2017-0023>
- Damiani, N., Porrini, M. P., Lancia, J. P., Álvarez, E., Garrido, P. M., Domínguez, E., Gende, L. B., y Eguaras, M. J. (2017b). Effect of propolis oral intake on physiological condition of young worker honey bees, *apis mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*, 61(2), 193–202. <https://doi.org/10.1515/JAS-2017-0023>
- De Groot, A. C. (2013). Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24(6), 263–282. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000011>
- de Miranda, J. (2012). Viruses In Bees. *Bee World*, 89(1), 2–5. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2012.11417446>
- de Miranda, J. R., Bailey, L., Ball, B. V., Blanchard, P., Budge, G. E., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D. C., Ribière, M., Ryabov, E., De Smet, L., y van der Steen, J. J. M. (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–56. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- de Miranda, J. R., y Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S48–S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
- Delaplane, K. S., Dag, A., Danka, R. G., Freitas, B. M., Garibaldi, L. A., Goodwin, R. M., y Hormaza, J. I. (2013). Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.12>
- 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., y Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- Domingo, E., y Holland, J. J. (2003). RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Micro.51.1.151>, 51, 151–178. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.51.1.151>
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., y Arias, A. (2006). Viruses as Quasispecies: Biological Implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 299, 51–82. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_3
- Doublet, V., Natsopoulou, M. E., Zschiesche, L., y Paxton, R. J. (2015). Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124, 31–34. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.007>
- Drescher, N., Klein, A. M., Neumann, P., Yañez, O., y Leonhardt, S. D. (2017). Inside honeybee hives: Impact of natural propolis on the ectoparasitic mite *Varroa destructor* and viruses. *Insects*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/insects8010015>
- Edward Holmes. (2009). The Evolution and Emergence of RNA Viruses - Edward C. Holmes - Google Books. In *Oxford University Press*. <https://books.google.com.uy/books?hl=esylr=yid=fpoUDAAQAjyoi=fndypg=PR9ydq=Holmes,+E.C.+The+Evolution+and+Emergence+of+RNA+Viruses%3B+Oxford>

+University+Press:+Oxford,+UK,+2009.yots=6lmW9doAYYsig=FodTQEI_g5MESR8
TnHPthlM7ft4#v=onepageyqyf=false

Evans, J. D. (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.004>

Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J.-L. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., y Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*, 15(5), 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>

Evans, J. D., y Pettis, J. S. (2005). COLONY-LEVEL IMPACTS OF IMMUNE RESPONSIVENESS IN HONEY BEES, *APIS MELLIFERA*. *Evolution*, 59(10), 2270–2274. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb00935.x>

Evans, J. D., y Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S62–S72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>

FAO. (2018). FAO 2018. *FAO*, May.

Fischer, O., y Schmid-Hempel, P. (2005). Selection by parasites may increase host recombination frequency. *Biology Letters*, 1(2), 193–195. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0296>

Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S73–S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>

Fries, I. (2011). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(2010), S73–S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>

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., y Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>

Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B., y 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., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P., y Higes, M. (2006). Natural infections of *nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45(4), 230–233. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101355>

Garcia, R. C., De Oliveira, N. T. E., Camargo, S. C., Pires, B. G., De Oliveira, C. A. L., Teixeira, R. de A., y Pickler, M. A. (2013). Honey and propolis production, hygiene and defense behaviors of two generations of Africanized honey bees. *Scientia Agricola*, 70(2), 74–81. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000200003>

Garedew, A., Schmolz, E., y Lamprecht, I. (2004). Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: An in vitro approach. *Thermochimica Acta*, 422(1–2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.05.037>

Garedew, A., Schmolz, E., Schrick, B., y Lamprecht, I. (2002). *Microcalorimetric investigation of the action of propolis on Varroa destructor mites*. 382, 211–220.

- Garrido, P. M., Antúnez, K., Martín, M., Porrini, M. P., Zunino, P., y Eguaras, M. J. (2013). Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. In *Journal of Insect Physiology* (Vol. 59, Issue 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.019>
- Genersch, E., y Ashiralieva, A. (2006). Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - A review. In *Apidologie* (Vol. 37, Issue 4, pp. 411–420). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/apido:2006028>
- Genersch, E., y Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41(6). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010027>
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, 60(2), 59–84. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>
- Gómez-Moracho, T., Heeb, P., y Mathieu, L. (2017). Effects of parasites and pathogens on bee cognition. *Ecological Entomology*, 42, 51–64. <https://doi.org/10.1111/een.12434>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., y Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Graystock, P., Goulson, D., y Hughes, W. O. H. (2015). *Parasites in bloom : flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species*.
- Grozinger, C. M., y Flenniken, M. L. (2019). Bee viruses: Ecology, pathogenicity, and impacts. *Annual Review of Entomology*, 64, 205–226. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111942>
- Harriet, J., Campiñá, J. P., Grajales, M., Lhiritier, C., Gómez Pajuelo, A., Mendoza-Spina, Y., y Carrasco-Letelier, L. (2017). Agricultural pesticides and veterinary substances in Uruguayan beeswax. *Chemosphere*, 177, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.131>
- Higes, M., Gómez-Moracho, T., Rodríguez-García, C., Botías, C., y Martín-Hernández, R. (2015). Preliminary effect of an experimental treatment with “Nozevit®”, (a phyto-pharmacological preparation) for *Nosema ceranae* control. <http://Dx.Doi.Org/10.3896/IBRA.1.53.4.03>, 53(4), 472–474. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.4.03>
- 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., y Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>
- Higes, M., Martín, R., y 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>
- Highfield, A. C., El Nagar, A., Mackinder, L. C. M., Noël, L. M. L. J., Hall, M. J., Martin, S. J., y Schroeder, D. C. (2009). Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7212–7220. <https://doi.org/10.1128/AEM.02227-09>
- Hoffman, R. M., Marshall, M. M., Polchert, D. M., y Jost, B. H. (2003).

Identification and characterization of two subpopulations of *Encephalitozoon intestinalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4966–4970. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4966-4970.2003>

Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., y Neov, B. (2020). Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Veterinary Sciences* 2020, Vol. 7, Page 166, 7(4), 166. <https://doi.org/10.3390/VETSCI7040166>

Huang, W.-F., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W., Wang, C.-H., Wei-fone, H., Jing-hao, J., Yue-wen, C., y Chung-hsiung, W. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38(1), 30–37. <https://doi.org/10.1051/apido>

Huang, W. F., Tsai, S. J., Lo, C. F., Soichi, Y., y Wang, C. H. (2004). The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(5), 473–481. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2003.12.005>

Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.-L., Jaffé, R., Jensen, A. B., Köhler, A., Magyar, J. P., Özkýrým, A., Pirk, C. W. W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D. R., ... Zheng, H.-Q. (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–53. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>

Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., y 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>

Johnson, R. M., Evans, J. D., Robinson, G. E., y Berenbaum, M. R. (2009). Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 14790–14795. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906970106>

Johnson, R. M., Mao, W., Pollock, H. S., Niu, G., Schuler, M. A., y Berenbaum, M. R. (2012). Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis Mellifera*. *PLoS ONE*, 7(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031051>

Keeling, P. J., y Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 93–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>

Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Ruz, M., Kryger, P., Quyet, D., Xuan, T., Puerta, F., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., y Paxton, R. J. (2011). *ARTICLE IN PRESS Widespread dispersal of the microsporidian Nosema ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, Apis mellifera. 2007.* <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014>

Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Ruz, M., Kryger, P., Quyet, D., Xuan, T., Puerta, F., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. J., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., ... 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., Klein, A. M., Vaissie, B. E., Steffan-dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., y Cedex, A. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological*

Sciences, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

Koleoglu, G., Goodwin, P. H., Reyes-Quintana, M., Hamiduzzaman, M. M., y Guzman-Novoa, E. (2018). Varroa destructor parasitism reduces hemocyte concentrations and prophenol oxidase gene expression in bees from two populations. *Parasitology Research* 2018 117:4, 117(4), 1175–1183. <https://doi.org/10.1007/S00436-018-5796-8>

Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S., y Tautz, J. (2007). The parasitic mite Varroa destructor affects non-associative learning in honey bee foragers, Apis mellifera L. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193(3), 363–370. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0192-8>

Kuenen, L. P. S., y Calderone, N. W. (1997). Transfers of Varroa mites from newly emerged bees: Preferences for age- and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 10(2), 213–228. <https://doi.org/10.1007/BF02765554>

Kukielka, D., Esperón, F., Higes, M., y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee Apis mellifera. *Journal of Virological Methods*, 147(2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.008>

Langenheim, J. H. (2003). Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. *Annals of Botany*, 93(6), 784–785. <https://doi.org/10.1093/aob/mch103>

Langstroth, L. L. (1857). A Practical Treatise on the Hive and Honey-bee. *Animals*, 572. <https://books.google.com/books?id=hLBIAAAAMAAJ>

Lanzi, G., de Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M., y Rossi, C. (2006). Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (Apis mellifera L.). *Journal of Virology*, 80(10), 4998–5009. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.10.4998-5009.2006>

Larsen, A., Reynaldi, F. J., Guzmán-Novoa, E., Larsen, A., Reynaldi, F. J., y Guzmán-Novoa, E. (2019). Fundaments of the honey bee (Apis mellifera) immune system. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(3), 705–728. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V10I3.4785>

Lauring, A. S., y Andino, R. (2010). Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLOS Pathogens*, 6(7), e1001005. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1001005>

Le Conte, Y., Sreng, L., y Trouiller, J. (1994). The recognition of larvae by worker honeybees. *Naturwissenschaften*, 81(10), 462–465. <https://doi.org/10.1007/s001140050110>

Levin, S., Sela, N., y Chejanovsky, N. (2016). Two novel viruses associated with the Apis mellifera pathogenic mite Varroa destructor. *Scientific Reports*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep37710>

Levin, S., Sela, N., Erez, T., Nestel, D., Pettis, J., Neumann, P., y Chejanovsky, N. (2019). New viruses from the Ectoparasite Mite Varroa destructor Infesting Apis mellifera and Apis cerana. *Viruses*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/v11010094>

Li, W., Evans, J. D., Li, J., Su, S., Hamilton, M., & Chen, Y. (2017). Spore load and immune response of honey bees naturally infected by Nosema ceranae. *Parasitology research*, 116(12), 3265–3274.

<https://doi.org/10.1007/s00436-017-5630-8>

López-Urbe, M. M., Fitzgerald, A., y Simone-Finstrom, M. (2017). Inducible versus constitutive social immunity: Examining effects of colony infection on glucose oxidase and defensin-1 production in honeybees. *Royal Society Open Science*, 4(5). <https://doi.org/10.1098/rsos.170224>

Maggi, M. D., Ruffinengo, S. R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., y Eguaras, M. J. (2011). Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa mites'* potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, 108(4), 815–821. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2122-5>

Manrique, A. J., y Soares, A. E. E. (2002). Start of africanized honey bee selection program for increased propolis production and its effect on honey production. *Interciencia*, 27(6), 312–316. https://www.researchgate.net/publication/297471840_Start_of_africanized_honey_bee_selection_program_for_increased_propolis_production_and_its_effect_on_honey_production

Marcucci, M. C. (1994). Propolis : chemical composition , biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(1), 83–99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>

Martin, S. J. (1998). *A population model for the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni in honey bee (Apis mellifera) colonies* . *Ecological Modelling* 109. 109(August), 267–281. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(98\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(98)00059-3)

Martin, S. J. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: A modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, 38(Allen 1960), 1082–1093.

Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., Nikaido, S., y Schroeder, D. C. (2012). Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science*, 336(6086), 1304–1306. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1220941>

McMahon, D. P., Natsopoulou, M. E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M. J. F., Gogol-Döring, A., y Paxton, R. J. (2016). Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1833). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0811>

Meana, A., Martín-Hernández, R., y Higes, M. (2010). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 49(2), 212–214. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.12>

Meyer, W., y Ulrich, W. (1956). “Propolis Bees” and Their Activities. *Bee World*, 37(2), 25–36. <https://doi.org/10.1080/0005772x.1956.11094916>

MGAP. (2010). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DE SANITIZACIÓN (POES) Y BUENAS PRÁCTICAS PARA SALAS DE EXTRACCIÓN DE MIEL*. 1–17.

Miranda, J. R. De, Genersch, E., de Miranda, J. R., y Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S48–S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>

Mordecai, G. J., Brettell, L. E., Martin, S. J., Dixon, D., Jones, I. M., y Schroeder, D. C. (2015). Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies. *The ISME Journal* 2016 10:5, 10(5), 1182–1191.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.186>

Mordecai, G. J., Wilfert, L., Martin, S. J., Jones, I. M., y Schroeder, D. C. (2016). Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *ISME Journal*, 10(5), 1264–1273. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.178>

Moret, Y., y Schmid-Hempel, P. (2000). Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science*, 290(5494), 1166–1168. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1166>

Moritz, R. F. A., Härtel, S., y Neumann, P. (2016). Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Http://Dx.Doi.Org/10.2980/I1195-6860-12-3-289.1*, 12(3), 289–301. <https://doi.org/10.2980/I1195-6860-12-3-289.1>

Nakamura, J., y Seeley, T. D. (2006). The functional organization of resin work in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60(3), 339–349. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0170-8>

Naree, S., Ellis, J. D., Benbow, M. E., y Suwannapong, G. (2021). The use of propolis for preventing and treating *Nosema ceranae* infection in western honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1787) workers. *Journal of Apicultural Research*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1905374>

Nazzi, F. y Le Conte, Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Ento-010715-023731*, 61, 417–432. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-010715-023731>

Neumann, P., y Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1–6. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>

Nicodemo, D., De Jong, D., Couto, R. H. N., y Malheiros, E. B. (2013). Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. *Web of Science*, 12(4), 6931–6938. <https://doi.org/10.4238/2013.DECEMBER.19.12>

Ohashi, K., Natori, S., y Kubo, T. (1999). Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 127–133. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.1999.00696.X>

Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology y 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)

Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees? *PLoS Biology*, 5(6), 1195–1199. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050168>

Ongus, J. R., Peters, D., Bonmatin, J. M., Bengsch, E., Vlak, J. M., y van Oers, M. M. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85(12), 3747–3755. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80470-0>

Padilha, A. H., Sattler, A., Cobuci, J. A., y McManus, C. M. (2013). Genetic parameters for five traits in Africanized honeybees using Bayesian inference. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2), 207–213. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000016>

Page, R. E., Robinson, G. E., Fondrk, M. K., y Nasr, M. E. (1995). Effects of worker

genotypic diversity on honey bee colony development and behavior (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36(6), 387–396. <https://doi.org/10.1007/BF00177334>

Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S., y 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>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Popova, M., Reyes, M., Le Conte, Y., y Bankova, V. (2014). *Propolis chemical composition and honeybee resistance against Varroa destructor*. 28(11), 788–794. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.881366>

Porrini, M. P., Sarlo, E. G., Medici, S. K., Garrido, P. M., Porrini, D. P., Damiani, N., y Eguaras, M. J. (2015). *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. [Http://Dx.Doi.Org/10.3896/IBRA.1.50.1.04](http://Dx.Doi.Org/10.3896/IBRA.1.50.1.04), 50(1), 35–41. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.04>

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., y Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines : trends , impacts and drivers. *Trends in Ecology y Evolution*, 25(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J., y Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. In *Nature* (Vol. 540, Issue 7632, pp. 220–229). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature20588>

Pritchard, D. J. (2016). Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1196016>, 55(1), 38–48. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1196016>

Pusceddu, M., Piluzza, G., Theodorou, P., Buffa, F., Ruiu, L., Bullitta, S., Floris, I., y Satta, A. (2019). Resin foraging dynamics in *Varroa destructor*-infested hives: a case of medication of kin? *Insect Science*, 26(2), 297–310. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12515>

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., y Van Engelsdorp, 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>

Rath, W. (1999). Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1051/apido:19990202>

Remnant, E. J. (2017). crossm A Diverse Range of Novel RNA Viruses. *Journal of Virology*, 91(16), 1–19.

Requier, F., Antúnez, K., Morales, C. L., Sánchez, P. A., Castilhos, D., Garrido, P. M., Giacobino, A., Reynaldi, F. J., Londoño, J. M. R., Santos, E., Garibaldi, L. A., Aldea Sánchez, P., Castilhos, D., Garrido, P. M., Giacobino, A., Reynaldi, F. J., Rosso Londoño, J. M., Santos, E., y 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>

Roberts, K. E., Evison, S. E. F., Baer, B., y Hughes, W. O. H. (2015). The cost of promiscuity: Sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports*, 5(April), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep10982>

Rodríguez-García, C., Evans, J. D., Li, W., Branchiccela, B., Li, J. H., Heerman, M. C., ... & Chen, Y. P. (2018). Nosemosis control in European honey bees, *Apis mellifera*, by silencing the gene encoding *Nosema ceranae* polar tube protein 3. *Journal of Experimental Biology*, 221(19), jeb184606.

Ronny Larsson, J. I. (1988). Identification of Microsporidian Genera (Protozoa, Microspora) - a Guide with Comments on the Taxonomy. *Archiv Fur Protistenkunde*, 136(1), 1–37. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(88\)80032-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(88)80032-0)

Rosenkranz, P., Aumeier, P., y Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

Ryabov, E. V., Wood, G. R., Fannon, J. M., Moore, J. D., Bull, J. C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., y Evans, D. J. (2014). A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or In Vitro, Transmission. *PLoS Pathogens*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004230>

Sano, O., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., y Kurimoto, M. (2003). Characterization of Royal Jelly Proteins in both Africanized and European Honeybees (*Apis mellifera*) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 15–20. <https://doi.org/10.1021/JF030340E>

Santos, E. (2014). *Jornada de Apicultura*. April.

Santos, E., Bonilla, O., y Branchiccela, B. (2019). Polinizadores en época de producción de frutas y semillas. *Revista INIA Uruguay*, 2019, No. 58, p. 24-27., 1–4.

Santos, F. A., Bastos, E. M. A. F., Maia, A. B. R. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., y Moreira, E. S. A. (2003). Brazilian propolis: Physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research*, 17(3), 285–289. <https://doi.org/10.1002/ptr.1117>

Schmid-Hempel. (1998). Parasites in Social Insects . Paul Schmid-Hempel. *The Quarterly Review of Biology*, 75(2), 191–191. <https://doi.org/10.1086/393425>

Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, 50(22), 529–551. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>

Schroeder, D. C., y Martin, S. J. (2012). Deformed wing virus. <http://Dx.Doi.Org/10.4161/Viru.22219>, 3(7). <https://doi.org/10.4161/VIRU.22219>

Schurr, F., Tison, A., Militano, L., Cheviron, N., Sircoulomb, F., Rivière, M. P., Ribière-Chabert, M., Thiéry, R., y Dubois, E. (2019). Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. *Journal of Virological Methods*, 270, 70–78. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2019.04.020>

Sector apícola: situación y perspectivas. Alejandra Carrau y Sebastián Bianchi. shorturl.at/qDP17

Seeley, T. D., y Morse, R. A. (1976). The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* 1976 23:4, 23(4), 495–512. <https://doi.org/10.1007/BF02223477>

Sinpoo, C., Disayathanoowat, T., Williams, P. H., & Chantawannakul, P. (2019). Prevalence of infection by the microsporidian *Nosema* spp. in native bumblebees

(*Bombus* spp.) in northern Thailand. *PLoS One*, 14(3), e0213171.

Sforzin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>

Sforzin, J. M., y Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>

Simone-Finstrom, M., Borba, R. S., Wilson, M., y Spivak, M. (2017). Propolis counteracts some threats to honey bee health. In *Insects* (Vol. 8, Issue 2, pp. 1–20). <https://doi.org/10.3390/insects8020046>

Simone-Finstrom, M. D., y Spivak, M. (2012). Increased Resin Collection after Parasite Challenge: A Case of Self-Medication in Honey Bees? *PLOS ONE*, 7(3), e34601. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034601>

Simone-Finstrom, M., Foo, B., Tarpy, D. R., y Starks, P. T. (2014). Impact of Food Availability, Pathogen Exposure, and Genetic Diversity on Thermoregulation in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Behavior* 2014 27:4, 27(4), 527–539. <https://doi.org/10.1007/S10905-014-9447-3>

Simone-Finstrom, M., y Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. In *Apidologie* (Vol. 41, Issue 3, pp. 295–311). <https://doi.org/10.1051/apido/2010016>

Simone, M., Evans, J. D., y Spivak, M. (2009). RESIN COLLECTION AND SOCIAL IMMUNITY IN HONEY BEES. *Langenheim* 2003, 3016–3022. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00772.x>

Sulborska, A., Horecka, B., Cebur, M., Kowalczyk, M., Skrzypek, T. H., Kazimierzak, W., Trytek, M., y Borsuk, G. (2019). Microsporidia *Nosema* spp. – obligate bee parasites are transmitted by air. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50974-8>

Suwannapong, G., Maksong, S., y Benbow, M. E. (2011). Stingless Bee Propolis Effects on Experimental Infection of *Apis florea* with *Nosema ceranae*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 1, 818–825.

Suwannapong, G., Maksong, S., Phainchajoen, M., Benbow, M. E., y Mayack, C. (2018). Survival and health improvement of *Nosema* infected *Apis florea* (Hymenoptera: Apidae) bees after treatment with propolis extract. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(2), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.02.006>

Takashima, S., Ohari, Y., y Itagaki, T. (2021). Prevalence of *Nosema* species infections in *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera* honeybees in the Tohoku region of Japan. *Parasitology International*, 83, 102361. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2021.102361>

Teixeira, É. W., Negri, G., Meira, R. M. S. A., Message, D., y Salatino, A. (2005). *Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry*. 2(January), 85–92. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh055>

Tokarev, Y. S., Huang, W. F., Solter, L. F., Malysh, J. M., Becnel, J. J., y Vossbrinck, C. R. (2020). A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169, 107279. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2019.107279>

Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., y Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin.

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/697390>

Wilfert, L., Long, G., Leggett, H. C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S. J. M., y Boots, M. (2016). Honeybee disease: Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by Varroa mites. *Science*, 351(6273), 594–597. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAC9976/SUPPL_FILE/AAC9976-WILFERT-SM.PDF

Williams, G. R., Sampson, M. A., Shutler, D., y Rogers, R. E. L. (2008). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), 342–344. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2008.04.005>

Wilson-rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H., y Starks, P. T. (2009). *Genetic , Individual , and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies*. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>

Yang, X., y Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470–7475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>

Yemor, T., Phiancharoen, M., Eric Benbow, M., y Suwannapong, G. (2015). Efectos de propóleos de abejas sin aguijón en abejas asiáticas *Apis cerana* infectadas con *Nosema ceranae*. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 468–473. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1162447>

Yue, C., y Genersch, E. (2005). RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 86(12), 3419–3424. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81401-0>

Zheng, H. Q., Gong, H. R., Huang, S. K., Sohr, A., Hu, F. L., y Chen, Y. P. (2015). Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus. *Veterinary Microbiology*, 177(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.003>