

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Cs. Biológicas

**Estudio de los factores de riesgo asociados a la presencia de la
Nosemosis y su impacto en la producción de miel en ambientes sub-
tropicales y templados**

Nombre y Apellido Tesista: Adriana Cecilia Pacini

Director de Tesis: Marcelo Lisandro Signorini

Co-directora de Tesis: Natalia Verónica Bulacio Cagnolo

Lugar de realización: Estación Experimental Agropecuaria Rafaela INTA

-2018-

Agradecimientos

La presente tesis se pudo llevar a cabo gracias a la participación de muchas personas, sin ellos, esto no hubiese sido posible.

En primer lugar, un agradecimiento especial a la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, que permite que la educación Pública mantenga su prestigio.

Mi mayor agradecimiento a las personas que comparten mates, charlas, proyectos, ideas y demás, en oficinas mediante. Son ustedes quienes ayudaron todos estos años para que esta tesis se concrete. Gracias por confiar en mi y por colaborar en todo lo que estuvo a su alcance Ago, Ana, Nati, Juli, Ema, Chelo y Cesar.

Gracias a Graciela y Alejandra por colaborar en la organización y logística de la tesis. Gracias a los productores y técnicos quienes aportaron sus colmenas y su tiempo para realizar los muestreos en las distintas regiones, esperando que la información aportada sea insumo para mejorar la producción en sus colmenas.

Gracias a las chicas del laboratorio de Genética de INTA Castelar quienes realizaron la determinación de haplotipos de *Apis mellifera* y a quienes realizaron la determinación de especies en el Instituto de Patobiología de INTA Castelar.

Por último, pero no menos importante, gracias a mi familia que siempre está dispuesta a dar una mano y que me acompañó en todo momento. Gracias a mis amigos, los de siempre y los más recientes, principalmente por el aguante.

INDICE

Publicaciones.....	6
RESUMEN Y ABSTRACT	7
Resumen	8
Abstract	11
Introducción general	14
Objetivo general:	30
Objetivos específicos	30
Capítulo I: Caracterización de los ambientes mediante curvas de floración y técnicas de manejo apícola utilizadas en cada región agro-ecológica	32
Introducción	33
Materiales y métodos	35
Resultados	37
Discusión	50
Conclusiones	57
Capítulo II: Variación anual de la infección con <i>Nosema</i> spp. en colmena emplazadas en diferentes regiones agro-ecológicas.....	59
Introducción	60
Materiales y métodos	62
Resultados	63
Discusión	82
Conclusiones	85

Capítulo III: Caracterización genética de ejemplares de <i>Nosema</i> spp. con relación a las regiones agro-ecológicas y a la diversidad genética de <i>Apis mellifera</i>	87
Introducción	88
Materiales y métodos	90
Resultados	93
Discusión	97
Conclusiones	101
Capítulo IV: Identificación de factores de riesgo asociados a la presencia de <i>Nosema</i> spp. luego de la cosecha de miel	102
Introducción	103
Materiales y métodos	104
Resultados	109
Discusión	116
Conclusiones	121
Capítulo V: Identificación de factores de riesgo asociados a la presencia de <i>Nosema</i> spp. en el ingreso a la invernada y al inicio de la primavera	122
Introducción	123
Materiales y métodos	124
Resultados	128
Discusión	141
Conclusiones	147
DISCUSIÓN GENERAL.....	148
Discusión general	149

CONCLUSIONES GENERALES	151
Conclusiones generales	152
Perspectiva	153
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
Referencias bibliográficas	155
ANEXOS.....	174
Anexo 1: Encuestas realizadas a técnicos apícolas, para armar curvas de floración.....	175
Anexo 2: Encuesta post-cosecha 2015, realizada a productores apícolas que participaron del monitoreo.	177
Anexo3: Encuesta otoño 2015, realizada a productores apícolas que participaron del monitoreo	182
Anexo 4: Encuesta inicio de temporada (Primavera 2015) realizada a productores apícolas que participaron del monitoreo	183

Publicaciones

Al Molineri, A Giacobino, **A Pacini**, N Bulacio-Cagnolo, A Aignasse, L Zago, N Fondevila, C Ferrufino, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, H Pietronave, ML Signorini (2018). Environment and *Varroa destructor* management as determinant of colony losses in apiaries under temperate and subtropical climate. *Journal of Apicultural Research*,57(4):1-14.

Al Molineri, **A Pacini**, A Giacobino, N Bulacio-Cagnolo, A Aignasse, L Zago, N Fondevila, C Ferrufino, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, H Pietronave, ML Signorini (2017). Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 49(2):166---173.

Al Molineri, A Giacobino, **A Pacini**, N Bulacio Cagnolo, N Fondevila, C Ferrufino, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, G Masciangelo, H Pietronave, M Signorini (2017). Risk factors for the presence of Deformed wing virus and Acute bee paralysis virus under temperate and subtropical climate in Argentinian bee colonies. *Preventive Veterinary Science* 140(1): 106-115.

A Giacobino, **A Pacini**, A Molineri, N Bulacio Cagnolo, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, G Masciangelo, H Pietronave, M Signorini (2017). Environment of beekeeping management: what explain better the prevalence of honey bee colonies with high levels of *Varroa destructor*? *Research in Veterinary Science* 112: 1-6.

A Pacini, A Mira, A Molineri, A Giacobino, N Bulacio Cagnolo, A Aignasse, L Zago, M Izaguirre, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, H Pietronave, R Russo, A Sacanappieco, S Lanzavecchia, L Schnittger, M Signorini (2016). Distribution and prevalence of *Nosema apis* and *N. ceranae* in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 141: 34-37.

A Pacini, A Molineri, A Giacobino, N Bulacio Cagnolo, A Aignasse, L Zago, M Izaguirre, J Merke, A Mira, E Orellano, E Bertozzi, H Pietronave, M Signorini (2016). Risk factors associated with the abundance of *Nosema* spp. in apiaries located in temperate and subtropical conditions after honey harvest. *Journal of Apicultural Research* 55(4): 342-350

RESUMEN Y ABSTRACT

Resumen

Argentina es el segundo exportador mundial de miel (13% del total) y el cuarto productor (contribuyendo con el 6%). El país comercializa en el exterior el 95% de la miel producida principalmente a la Unión Europea, Estados Unidos y Japón. No obstante, la producción local se ha reducido considerablemente a lo largo de los últimos años, pasando de un promedio de 84.000 toneladas anuales, en el período 2000-2009, a menos de 60.000 toneladas anuales en los últimos dos años. El aumento de la actividad productiva se ve amenazado tanto por problemas sanitarios como por el avance de la frontera agrícola que reduce la biodiversidad vegetal.

Dentro de los problemas sanitarios que se desconoce su impacto aún no resueltos destaca la Nosemosis, una enfermedad causada por dos especies de microsporidios (Phylum Microspora), *Nosema apis* y *N. ceranae*. Estos agentes son comúnmente encontrados en abejas (*Apis mellifera*) alrededor del mundo. Estos agentes son parásitos obligados que se desarrollan en el intestino de las abejas adultas y generan una considerable reducción en la vida de sus hospedadores. La transmisión de Nosema en abejas se realiza mediante la vía fecal-oral por medio del cual los patógenos se diseminan con las heces de individuos infectados a abejas sanas vía ingestión. A nivel mundial se ha generado una gran controversia sobre el rol que tendría estos agentes en la pérdida de colmenas. El presente trabajo tuvo como objetivos identificar, mediante un abordaje epidemiológico, los factores que determinan la ocurrencia de Nosemosis, evaluar el patrón de comportamiento estacional de la enfermedad y caracterizar genéticamente las poblaciones de *Nosema* spp. en diferentes ecosistemas de nuestro país, buscando estimar el impacto real sobre la producción de miel.

En primera instancia se evaluó la carga de esporos de *Nosema* spp. mensualmente a lo largo de un año en un total de 19 apiarios ubicados en cinco regiones agro-ecológicas (Santa Fe Sur, Santa Fe Centro, Chaco Húmedo, Chaco de Transición y Chaco Semi-árido) de las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa para determinar el comportamiento estacional de dicho parásito. Los resultados obtenidos de las curvas de esporulación en las provincias analizadas indican un patrón característico, similar al reportado para la especie *N. apis* en otras regiones del mundo. Dicho patrón solo varía en función de las intensidades en cada región analizada, siendo las regiones de Santa Fe Sur y Centro y Chaco Semi-árido las que presentaron mayores niveles esporulares.

En las mismas regiones se analizaron muestras para determinar la especie de *Nosema* spp. presente en 59 apiarios analizados en el período post-cosecha. Los resultados moleculares indicaron que en las regiones bajo estudio se encuentran presentes ambas especies. Se registró infección exclusiva por *N. ceranae* en 37,8% de los apiarios analizados, mientras que en 26,7% de los apiarios solo estaban infectados por *N. apis*. El resto, 35,6% de los apiarios, se encontraron co-infectados por ambas especies de *Nosema* spp.. Dichos resultados fueron contradictorios con otros reportados por investigadores de otras regiones de Argentina donde solo *N. ceranae*. Los resultados también indicaron la presencia de colmenas infectadas puramente con *N. ceranae* en todas las regiones estudiadas, la presencia de colmenas con infección exclusiva con *N. apis* en regiones de climas subtropicales y una proporción significativamente mayor de co-infección en las regiones de clima templado del estudio. Estos resultados podrían dar cuenta del posible reemplazo de *N. apis* por *N. ceranae* ya reportado en otras regiones. Se determinó la relación existente entre la presencia de las distintas especies de *Nosema* spp. y el haplotipo de abeja que parasitan sin hallar una asociación entre el haplotipo del hospedador y la especie de parásito.

Por último, para identificar factores de riesgo asociados a la ocurrencia de altas cargas de *Nosema* spp., se realizaron tres muestreos durante un año en 64 apiarios en las regiones mencionadas previamente, junto con encuestas estructuradas realizadas a los apicultores para asociar variables de manejo con el riesgo de alcanzar altas cargas de parasitación. Entre los factores identificados se destacan las diferentes regiones agro-ecológicas y la presencia de *Varroa destructor* en altos y bajos niveles de infestación. En el primer muestreo, período post-cosecha, se distinguió una clara relación de dichos factores sobre los niveles de infección de *Nosema* spp. En cuanto al efecto debido a las regiones agro-ecológicas, se observó un marcado gradiente ascendente de Norte a Sur. Asimismo, se determinó una asociación positiva entre los recuentos de esporos de *Nosema* spp. y los niveles de infestación con *Varroa*. Aquellas colmenas que presentaban más de 3% de *Varroa* en el período post-cosecha tenían mayores niveles esporulares de *Nosema* spp. En el segundo y tercer muestreo, período de otoño y primavera, se observaron los niveles más altos de esporos de *Nosema* spp. en las regiones de Sur y Centro de Santa Fe y en Chaco Semi-árido. Con relación a las cargas de *Nosema* spp. y la infestación con *Varroa*, la relación se invirtió y se determinó que aquellas colmenas que presentaban menos de 1% de *Varroa* en otoño y primavera fueron las que presentaban mayores niveles

esporulares. Esta situación se debió en parte a la aplicación de un producto acaricida para controlar la parasitación por *Varroa* en 80% de las colmenas analizadas. Por otro lado, se determinaron factores de manejo asociados a niveles altos de esporos de *Nosema* spp. en regiones de Chaco Semi-árido, siendo que aquellas colmenas donde se realizaba el recambio de reinas con una frecuencia mayor a dos años o no se realizaba, presentaban un mayor desarrollo de la parasitosis. Por otro lado, las colmenas que recibieron algún tipo de suplemento polivitamínico o de polen tuvieron mayores niveles esporulares.

Estos resultados brindan algunas respuestas a los apicultores. Por un lado, existe un patrón estacional de la parasitosis y los apicultores deberían estar atentos a los momentos en los que se encuentran los picos de cargas máximas de esporos de *Nosema* spp. Por otro lado, se deberían tomar medidas de control sobre otros patógenos, como es el caso del ácaro *V. destructor*, para disminuir el estrés dentro de las colmenas. Cabe aclarar que la parasitosis no presentó un efecto directo en la producción de miel ni en el estado general de las colmenas durante el año en el que se realizó el trabajo, lo que estaría indicando que, a pesar de encontrarse niveles elevados en algunas regiones, el parásito no llega a generar graves daños en la colmena.

Abstract

Argentina is the second world exporter of honey (13% of the total) and the third producer (contributing with 6%). Our country markets abroad 95% of the honey produced mainly to the UE, the United States and Japan. However, local production has been reduced considerably in recent years, from an average of 84,000 tons to less than 60,000 tons per year in the last two years. The increase in productive activity is threatened by health problems and the advance of the agricultural frontier that reduces plant biodiversity.

Among the health problems still unresolved highlight Nosemosis, a disease caused by two species of microsporidiums (Phylum Microspora), *Nosema apis* and *N. ceranae*. These agents are commonly found in bees (*Apis mellifera*) around the world. They are obligate parasites that develop in the intestines of adult bees and generate a considerable reduction in the life of their hosts. The transmission of Nosema in bees is done through the fecal-oral route by means of which the pathogens are spread with the feces of infected individuals to healthy bees by ingestion. Worldwide, a great controversy has been generated about the role that this agent would have in the loss of hives. The objective of this thesis was to determine, through an epidemiological approach, the factors that favor the occurrence of Nosemosis, evaluate the pattern of seasonal behavior of the disease and characterize genetically the populations of *Nosema* spp. in different ecosystems of Argentina, seeking to determine the real impact on honey production.

In the first instance, the number of spores and prevalence of *Nosema* spp. monthly were estimated over a year in a total of 19 apiaries located in five regions (Santa Fe Sur, Santa Fe Centro, Chaco Húmedo, Chaco de Transición and Chaco Semi-arid) of Santa Fe, Chaco and Formosa provinces to determine the seasonal behavior of the parasite. The results obtained from the sporulation curves in the colony analyzed indicate a characteristic pattern, similar to that reported for the *Nosema apis* in other regions of the world. This pattern only varies depending on the intensities in each region analyzed, with Santa Fe Sur and Centro and Chaco Semi-arid the regions with the highest sporular levels.

In the same regions, samples of bees were collected and analyzed to determine the species of *Nosema* spp. present in 59 apiaries during the post-harvest period. The molecular results indicated that both species are present in the regions under study.

Exclusive infection by *N. ceranae* was recorded in 37.8% of all apiaries, while in 26.7% of the apiaries were only infected by *N. apis*. The rest, 35.6% of the apiaries, were co-infected by both species of *Nosema* spp. These results were contradictory with others reported by researchers from other regions of Argentina where it was only possible to obtain positive samples exclusively from *N. ceranae*. The results also indicated the presence of hives infected purely with *N. ceranae* in all the regions studied, the presence of hives with exclusive infection with *N. apis* in regions of subtropical climates and a significantly higher proportion of co-infection in temperate climate regions. These results could account for the possible replacement of *N. apis* by *N. ceranae* already reported in other regions. The existence of association between the presence of different species of *Nosema* spp. and bee haplotypes that were parasitized. The results did not demonstrate the existence of an association between the host haplotype and the parasite species.

Finally, to identify risk factors associated with the occurrence of high loads of *Nosema* spp., three samplings were carried out during one year in 65 apiaries in the previously mentioned regions. Structured surveys were applied to beekeepers with the aim to associate management variables with the risk of high parasitic loads in honey bees. Among the factors identified, the different regions analyzed and the presence of *Varroa destructor* in high and low levels of infestation, were the most relevant. In the first sampling, post-harvest period, an marked ascending gradient was observed from North to South. Additionally, a positive association was determined between spore counts of *Nosema* spp. and the levels of infestation with *Varroa*. Those hives that presented more than 3% of *Varroa* in the post-harvest period had higher sporular levels of *Nosema* spp. In the second and third sampling, the autumn and spring period, the highest levels of *Nosema* spp. were found in South and Center of Santa Fe and in Chaco Semi-arid regions. Regarding the loads of *Nosema* spp. and the *Varroa* infestation, the relationship was reversed and it was determined that those beehives that presented more than 1% of *Varroa* in autumn and spring had the highest sporular levels. This paradoxical situation may be explained because the application of an acaricide product to control *Varroa* parasitization in 80% of the hives analyzed. On the other hand, management factors associated with high levels of *Nosema* spp spores were determined in Semi-arid Chaco regions. Those hives whose queens were changed reigns every two years or more had a greater development of parasitism. On the other hand, hives that received a polyvitaminic or pollen supplement had higher sporulation levels.

These results provide some answers to beekeepers, there is a seasonal pattern of parasitosis, beekeepers should be attentive to the moments in which peaks of maximum levels of *Nosema* spp. spores and should take control measures of other pathogens such as the mite *V. destructor* to reduce stress within the hives. It should be noted that the parasitosis did not have a direct effect on the honey production or on the general state of the hives during the year in which the work was carried out. This could be indicating that despite being found high levels in some regions, the parasite does not get to generate serious damage in the hive.

Introducción general

Argentina ocupa un lugar destacado en la producción de miel ya que es el segundo exportador mundial (13% del total) y el cuarto productor después de China, la Unión Europea y Turquía. El país comercializa en el exterior el 95% de la miel producida debido al bajo consumo interno y a la gran demanda, principalmente de Estados Unidos, Alemania y Japón. Con base en el Registro Nacional de Productor Apícola, existen 10.574 productores con datos actualizados de sus apiarios, que registran 30.605 apiarios con su posición geolocalizada, conformando un total de 2.612.477 colmenas a nivel nacional. La actividad productiva está constituida por medianos y pequeños productores y empresas familiares distribuidas en todo el país. Representa una de las actividades principales para la agricultura familiar y las economías regionales. En el año 2017 la exportación de miel fue de 56.265 T. por un monto superior a U\$S 145 millones [1].

Sin embargo, el aumento de la actividad productiva se ve amenazado tanto por problemas sanitarios como por el avance de la frontera agrícola que reduce la biodiversidad vegetal. Dentro de los problemas sanitarios aún no resueltos destaca la Nosemosis, una enfermedad causada por dos especies de microsporidios (Phylum Microspora), *N. apis* y *N. ceranae*. Estos agentes son comúnmente encontrados en abejas (*A. mellifera*) alrededor del mundo [1]. La infección por *N. apis* fue descrita hace más de cien años estando bien estudiada la patología que genera [2]. Hace algunos años fue identificada [3] una nueva especie, *N. ceranae*, infectando abejas europeas en España, que actualmente se encuentra distribuida en todos los países del mundo.

Estos agentes son parásitos obligados que se desarrollan en el intestino de las abejas adultas y generan una considerable reducción en la vida de sus hospedadores. La transmisión de *Nosema* spp. en abejas se realiza mediante la vía fecal-oral por medio del cual los patógenos se diseminan con las heces de individuos infectados a abejas sanas. Los adultos sanos ingieren esporos de *Nosema* spp. al consumir alimentos contaminados o cuando están abocadas a las tareas de limpieza del material fecal en el interior de las colmenas [4].

A nivel mundial se ha generado una gran controversia sobre el rol que tendría este agente en la pérdida de colmenas, tanto por causas directas o como consecuencia de un debilitamiento en las colmenas. Aún restan por dilucidar muchos aspectos sobre la

patogenicidad de *Nosema* spp. y su impacto sobre la sanidad y productividad de las colmenas considerando las variaciones geográficas y estacionales [5, 6].

En Argentina son escasos los estudios que hayan analizado el impacto real de las infecciones por *Nosema* spp. sobre las abejas y su interacción con las condiciones ambientales. Sarlo [7] concluyó, con base en diferentes estudios observacionales realizados en la región sudeste de la provincia de Buenos Aires, que la Nosemosis (especialmente causada por *N. ceranae*) resulta una patología que genera intensa mortalidad y retrasos en el desarrollo de las colonias. Estos estudios confirmaron que los recuentos de esporos de *N. ceranae* en las colonias presenta una dinámica estacional que se correlaciona negativamente con la temperatura, no así con la humedad.

En la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA se desarrolló durante marzo de 2007 y hasta diciembre de 2010, un estudio de tipo observacional, muestreando mensualmente apiarios localizados en diferentes regiones de la Provincia de Santa Fe. Los apiarios mostraron variaciones anuales tanto en la prevalencia de colmenas positivas a *Nosema* spp. (desde 59,7% en 2009 hasta 94,4% en 2010) como en los recuentos de esporos de *Nosema* spp. (desde 152.000 esporos/abeja en 2009 hasta 867.000 esporos/abeja en 2007). Los recuentos de esporos mostraron estacionalidad, observándose dos picos (otoño e inicio de la primavera). También fue posible asociar los recuentos de esporos de *Nosema* spp. a la ubicación geográfica de los apiarios, siendo elevados los recuentos en aquellos localizados cerca del Río Paraná, disminuyendo la carga en apiarios alejados del mismo [8, 9]. Por otro lado, los resultados de dichos trabajos compararon colmenas con tratamiento de fumagilina y sin dicho tratamiento, colmenas control e indicaron una reducción en las intensidades de *N. ceranae*, pero no se determinaron diferencias significativas entre los grupos tratados y de control para las medidas de resistencia de colmenas, incluida la población de abejas adultas, la disponibilidad de crías de abejas, la miel o el polen. La población de abejas durante el invierno se redujo tanto en las colmenas tratadas como en las de control.

A pesar de que se reconoce a la Nosemosis como un serio problema sanitario para la apicultura capaz de generar graves mortandades de colonias y por ende pérdidas económicas en distintas regiones apícolas [7], poco se conoce acerca de los factores que influyen sobre su ocurrencia y diseminación, y si las altas cargas de *Nosema* spp. pueden tener efecto directo sobre el desarrollo y la producción de colmenas en distintas regiones

de Argentina. Por ello, resulta imprescindible realizar un análisis epidemiológico que permita identificar los factores que propician la ocurrencia de Nosemosis, evaluar el patrón de comportamiento estacional de la enfermedad y caracterizar genéticamente las poblaciones de *Nosema* spp. en diferentes ecosistemas de nuestro país, con especial énfasis en el estudio del impacto real de la Nosemosis sobre la producción de miel.

Phylum Microsporidia

Los microsporidios infectan las células del hospedador, se replican dentro de ellas, producen esporas y luego se transmiten a otras células dentro del mismo hospedador o a uno nuevo. Sin embargo, las diferentes formas en que lo logran y la diversidad de especies hospedantes que parasitan indican el número de vías evolutivas que estos organismos han logrado alcanzar con éxito para adaptarse a las necesidades de sus propias historias de vida y las de sus hospedadores [10].

Es un grupo de gran importancia ya que parasita insectos de relevancia económica como las abejas melíferas y se encuentran en estrecha relación filogenética con los hongos [11, 12, 13]. Las relaciones formadas por los microsporidios con los insectos, son formas extremas de simbiosis. Estos organismos son eucariotas unicelulares, parásitos intracelulares obligados de muchas especies de vertebrados e invertebrados [14, 15]. Actualmente existen cerca de 143 géneros de microsporidios descritos y cerca de 1000 especies. Casi la mitad de esos géneros (69) tienen un insecto como hospedador [14].

Los microsporidios producen esporas para protegerse contra las condiciones ambientales adversas. Esas esporas poseen paredes proteicas y son de tamaño pequeño, variando de 1 a 10 μm de largo dependiendo de la especie. Casi todas las especies de microsporidios experimentan su crecimiento y producción de esporas dentro del citoplasma de la célula hospedadora. No se desarrollan microsporidios fuera de sus células hospedadoras, ya que estos parásitos requieren el ambiente celular para la absorción de energía y nutrientes [10].

Son organismos altamente especializados, han logrado una reducción muy importante a nivel morfológico, metabólico, bioquímico y a nivel molecular de genes y genoma [14]. Se ha producido una pérdida y posterior compactación de los genes [16], explicando las diferencias en tamaño dentro del Phylum. Por otro lado, se ha producido la pérdida de genes destinados a la biosíntesis de diversos componentes como nucleótidos, ácidos

grasos [17] y varios aminoácidos en este grupo de organismos, además de carecer de mitocondrias [18]. Son considerados como patógenos oportunistas debido a que es más probable que causen una enfermedad si el estatus inmunológico del hospedador es deficiente [19].

Mediante estudios ultraestructurales se ha observado que la célula hospedadora es un proveedor de recursos ya que existe una atracción física de los organelos del hospedador, especialmente las mitocondrias y el retículo endoplásmico, a la interfaz de la estructura que envuelve al parásito en desarrollo. Esto sugiere que el parásito está explotando los recursos de su célula hospedadora [10].

Se destaca que gran parte del conocimiento que se tiene sobre los microsporidios, se debe a que se han encontrado como importantes patógenos oportunistas de humanos inmunocompetidos, 17 especies han sido detectadas en humanos [20].

***Nosema* spp.**

Es el género más diverso, presenta cerca de 100 especies descritas [21]. Un representante de gran importancia dentro del género es *Nosema bombycis* [22]. Dicha especie se encontró asociada a la cría del insecto *Bombyx mori* y, fue descrito como el agente causal de la pebrina [23], la cual afectó de manera considerable la industria de la seda en Europa [24] y continúa siendo un serio problema al menos en China [25].

Existen dos especies del género que son conocidas por infectar el ventrículo o intestino medio de *A. mellifera*: *N. apis* y *N. ceranae* [26]. Las infecciones provocadas por ambas especies de *Nosema* primariamente son transmitidas vía exposición fecal-oral cuando las abejas limpian los marcos o consumen alimento o agua contaminada con esporos.

Durante varios años *N. apis* fue la principal especie que parasitaba *A. mellifera*, causando Nosemosis [27]. En 1994, se reporta *N. ceranae* en abejas asiáticas *Apis cerana* [28]. Para el 2006 y luego del renombrado Síndrome de Colapso de Colmenas [29], causante de muerte masiva de abejas en España, se reporta por primera vez el salto de hospedador de *A. cerana* a *A. mellifera* del microsporidio *N. ceranae* [3]. Desde ese año, comienzan a surgir un gran número de investigaciones tendientes a determinar cuál es la especie que se encuentra parasitando a las abejas melíferas, ya que, de ser esta nueva especie, podría tener un efecto directo en la muerte de las colmenas.

En Taiwan se determinó la presencia de *N. ceranae* de muestras de 2005 [38]. Un trabajo realizado por Paxton y colaboradores [6] determinó que *N. ceranae* se encontraba parasitando a la abeja melífera de Finlandia desde 1998. Luego de un trabajo realizado por Klee y colaboradores en 2007 [39], se diseñó un mapa de distribución mundial de la especie, encontrándose en distintos países de Europa, Oceanía y América. Esta especie, se ha convertido en un patógeno distribuido globalmente [3, 5, 38, 99, 211]. En la última década, la detección de la infección por *N. ceranae* en las abejas ha aumentado en todo el mundo y más específicamente en los países del sur de Europa [285] y en América [211, 212, 279, 286,287]. Por el contrario, en los países del norte de Europa, *N. apis* sigue predominando sobre *N. ceranae* [65].

Se ha propuesto la hipótesis de que *N. ceranae* podría estar desplazando a *N. apis*, dada la mayor distribución en países del Sur de Europa (España, Italia, Israel, Grecia o Turquía) en relación a los del Norte (Suecia, Alemania). [39, 61, 93, 288, 293, 294]. Los datos de estos trabajos, revelan una zona de transición en la prevalencia relativa de las dos especies. No se ha podido determinar una ventaja competitiva entre las especies en cuestión y aparentemente tanto las variables ambientales como la competencia interespecies son importantes elementos de modelos matemáticos que ayudan a explicar la prevalencia diferencial de *Nosema* spp. en distintas regiones climáticas [295]. Sin embargo, debido a la amplia distribución registrada para *N. ceranae*, existe una ventaja, que aún no ha podido ser determinada, en relación a otras especies del género.

Los estudios, han reportado que *N. ceranae*, no sólo se encuentra parasitando a especies del genero *Apis*, como es el caso de *A. cerana* en China [289], *A. mellifera* [3, 38], *A. florea* en Tailandia, *A. dorsata* en Vietnam y Tailandia [296], y *A. koschevnikova* en Indonesia [84]. También su presencia ha sido detectada en diferentes polinizadores, como es el caso de especies del género *Bombus* en Argentina, Uruguay, Colombia, China y UK [30, 297, 298, 290, 291, 292] , en relación a estos polinizadores, se ha determinado que la riqueza de los parásitos en abejorros silvestres aumenta cuando se encuentran próximas a abejas melíferas criadas comercialmente [295].

Otra de las especies de abejas donde también se ha encontrado *N. ceranae* son las abejas sociales de los géneros *Melipona*, *Scaptotrigona*, *Tetragonisca* provenientes de Brasil y Argentina [213]. No solo las especies sociales se han detectado como portadoras de *N. ceranae*, también, abejas solitarias de los géneros *Osmia*, *Andrena* y *Heriades*

[299] se han identificado en Bélgica y dentro del grupo de los Vespidos, también se ha reportado su presencia en *Polybia scutellaris* de Argentina [213].

Características generales de *Nosema* spp.

Las infecciones provocadas por *Nosema* spp. se presentan principalmente cuando las abejas obreras realizan limpieza de los panales o al realizar la trofalaxia entre abejas infectadas y abejas sanas. En el momento que son consumidas, las esporas viajan a través del tracto digestivo de las abejas melíferas hasta que en la región del ventrículo germinan [32].

Estructuralmente presentan dos membranas, la exospora proteínica y electrodensa, y la endospora quitinosa y electrolúcida, que la hacen resistente a los factores ambientales adversos. Los esporos de *Nosema* spp. presentan un aparato nuclear diplocariotoco compuesto por dos núcleos adyacentes morfológicamente idénticos que se dividen en forma igual y sincrónica [32].

Ciclo de vida

El ciclo de vida de la mayoría de los microsporidios, en especial del género *Nosema* presenta las siguientes características (Figura 1):

La germinación de las esporas es dirigida por procesos que aún no están completamente claros. El desplazamiento del calcio intracelular y posterior anclaje calcio/calmodulina en la superficie de las esporas podría comenzar una cascada de señales que contribuirían al proceso de hinchamiento y turgencia del polaroplasto [33].

Una vez eyectado el esporoplasma dentro de la célula ventricular, comienza su crecimiento, en una fase denominada vegetativa o meronte. Pasadas las 24 horas de la infección, se inicia la merogonia, dando lugar a la división binaria de merontes diplocarióticos o por medio de fisión se producen cadenas multinucleadas [34]. Dichas estructuras son denominadas merozoitos, se asemejan a los merontes con un retículo endoplasmático bien desarrollado, esta es la fase proliferativa del ciclo de *Nosema*.

A continuación del desarrollo de los merontes se forman los esporontes, los cuales presentan una cubierta superficial de quitina. Por una única división binaria van a dar como resultado dos esporoblastos, formando esporos de pared fina o endoespora y un corto

filamento polar. Dichas esporas son consideradas esporas primarias o tempranas, se desarrollan en el interior de la célula o en células adyacentes [7, 35].

Luego de la germinación de estas esporas tempranas se produce nuevamente la inyección del esporoplasma, dando lugar a nuevos merontes. Por medio de múltiples divisiones se produce una segunda secuencia de esporulación [36]. Se forman nuevos esporontes diplocarióticos, por división de los mismos se vuelven a formar dos esporoblastos, en este caso se generan esporas maduras con endospora gruesa y un largo filamento polar, las cuales pueden provocar la lisis de la célula y salir al exterior por la luz intestinal con las heces, fase que se denomina esporogónica [7,35]. La fase infectiva la presentan los dos tipos de esporas que se desarrollan tanto la espora primaria, como la madura [14].

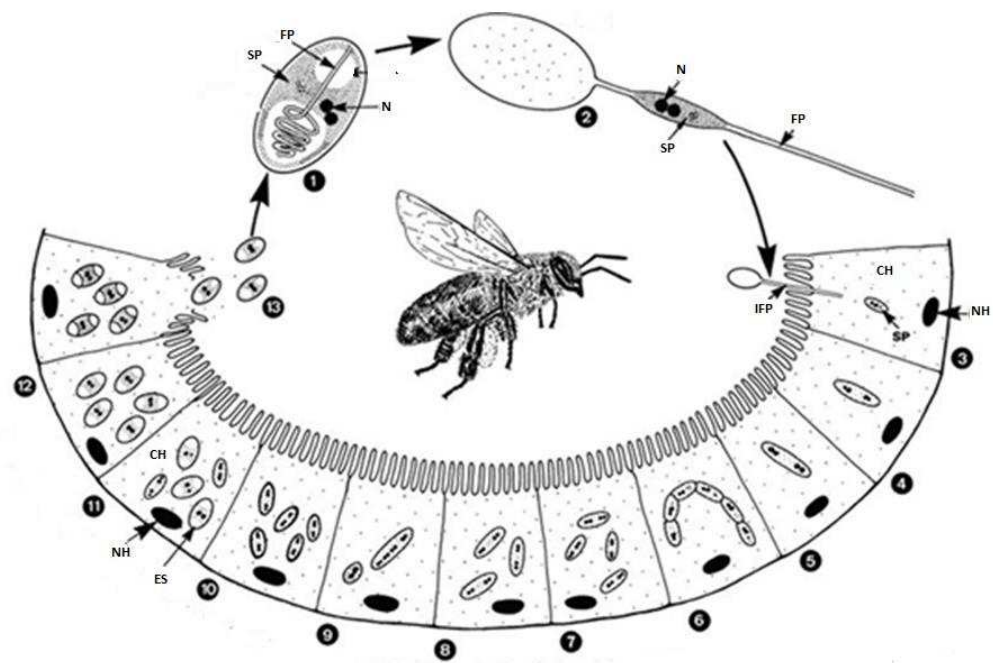


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *N. apis* y *N. ceranae* en células del epitelio ventricular de *A. mellifera*. 1-8. Fase proliferativa, 9-12. Fase esporogónica. 13. Fase infectiva. FP=Filamento polar, SP= esporoplasma, N= núcleo, NH=núcleo del hospedador, CH=célula del huesped, IFP=inyección del filamento polar, EN= esporoblastos. Modificada de Mehlhorn, H. 2007.

Nosemosis

La enfermedad causada por los microsporidios del género *Nosema* spp. es denominada Nosemosis, siendo las especies causantes de dicha enfermedad en las abejas melíferas *N. apis* [27, 37] y *N. ceranae* [3].

Durante cerca de 100 años se consideró a *N. apis* como el único agente etiológico causante de Nosemosis. Con el Síndrome de Colapso de Colmenas reportado primero en Europa y luego en Estados Unidos en los años 2006 y 2007, comenzaron a realizarse investigaciones tendientes a determinar las causas de dicho colapso y surge el hallazgo de *N. ceranae* en *A. mellifera* [3, 38, 39].

Dichas especies presentan ciertas diferencias con relación a aspectos morfológicos, patrones epidemiológicos y sintomatológicos que serán descriptos a continuación:

N. apis

Las esporas que produce *N. apis* presentan un tamaño de 6 µm de largo y 3 µm de ancho. Su filamento polar presenta entre 26-32 vueltas [40]. En el extremo posterior de la espora, se aloja una vacuola con material flocular. Toda su estructura se presenta rodeada por el esporoplasma.

Las abejas ingieren las esporas junto con alimentos o por medio de la trofalaxia [41, 42] y germinan después de que han alcanzado la luz del ventrículo [43]. Como todos los microsporidios, *N. apis* inyecta su esporoplasma en la célula hospedadora y completa su ciclo de desarrollo intracelularmente [44].

N. apis presenta un patrón característico en climas templados, con prevalencias bajas o niveles poco detectables durante el verano, un pequeño pico en otoño, un ligero aumento en el invierno y un gran pico en la primavera antes de que las abejas de invierno sean reemplazadas por abejas jóvenes [43, 45]. Existe muy poca información sobre la prevalencia estacional de *N. apis* en condiciones de climas tropicales o subtropicales. Según lo reportado por Fries y Raina [46], se revelaron niveles detectables de *N. apis* durante todo el año sin un patrón estacional.

La temperatura óptima para el desarrollo de esta especie ronda los 30-35°C [48]. Independientemente de la dosis inicial de esporas ingerida por las abejas, todo el

ventrículo se infecta dentro de las 2 semanas posteriores a la infección. Esto se debe a la autoinfección [48]. Al provocarse la lisis, por la gran cantidad de esporas dentro de la célula ventricular, son vertidas en la luz intestinal, las esporas recién formadas germinan, extendiendo así la infección a otras partes del intestino [41].

Según Chen y colaboradores [49] la reproducción de *N. apis* solo se detectó en las células del ventrículo de *A. mellifera*. Otros autores han mostrado la presencia de esporas de *N. apis* en otros tejidos diferentes al ventrículo, como son los ovarios, los túbulos de Malpighi y las glándulas salivares, mandibulares e hipofaríngeas de las abejas [27, 50] lo que podría indicar que dicha especie no presenta especificidad para el tipo de tejido a infectar.

Por otro lado, en otro estudio se ha sugerido la posible transmisión sexual de los esporos de *N. apis* [51] y se ha encontrado ADN de esta especie y de *N. ceranae* en el esperma de zánganos [52]. En este último trabajo también se demostró que reinas infectadas artificialmente no transmiten verticalmente los esporos de *Nosema* a sus huevos.

Las abejas parasitadas con *N. apis* sufren ciertas consecuencias a nivel individual y colonial. En ese aspecto, una de las más documentadas ha sido el acortamiento de la vida de las abejas, las cuales salen a pecorear a edades más tempranas [53, 54, 55].

Se ha detectado que la infección por *N. apis* en obreras jóvenes (1 y 2 días de edad) interrumpe el desarrollo del intestino medio [56]. Las lesiones producidas por la acción citolítica de los merontes se traducen en una disfunción en las células ventriculares del hospedador, extendiéndose la infección desde la parte posterior del ventrículo hacia la anterior [48, 57].

Las abejas que se encuentran parasitadas por *N. apis* suelen presentar gran cantidad de excremento en sus abdómenes lo que lo hace ver dilatado y distendido. Comúnmente, el signo característico de la enfermedad causada por *N. apis* es la diarrea (40), pero en algunos trabajos se han observado cargas muy altas de esporos en las abejas sin presentar esta sintomatología [58].

Se ha demostrado un menor consumo de oxígeno y agua, y mayor consumo de alimento en las abejas infectadas por *N. apis* en comparación con aquellas libres de infección [76]. Se ha observado una disminución de los aminoácidos presentes en la hemolinfa de las abejas infectadas con dicho parásito, indicando que la actividad metabólica de las abejas

infectadas fue menor que las abejas sanas [77]. Dicha disminución provoca una reducción de las glándulas hipofaríngeas [77, 78, 79] y un descenso de los niveles de proteínas en los cuerpos grasos [80]. En las abejas reinas también se han detectado infecciones con una reducción del tamaño de los ovarios, una degeneración de los oocitos [81] y una inhibición de la maduración de los huevos en las ovariolas, lo que podría deberse a un aporte energético deficiente [82].

En términos generales, las infecciones por *N. apis* se han visto asociadas a una reducción en la vida de las abejas infectadas y un incremento en la mortalidad invernal, con el consecuente impacto negativo en la fortaleza y la producción de las colmenas [35].

N. ceranae

Se han reportado infecciones de *N. ceranae* en *A. mellifera* que datan de mediados de 1990 en Estados Unidos [4], una muestra previa a 1990 de Uruguay [59] y el registro más antiguo, hasta el momento, se obtuvo en muestras de 1979 de Brasil [212]. Actualmente presenta una distribución global y en algunas regiones se especula que se encuentra desplazando a *N. apis* [39, 60].

Las esporas que produce *N. ceranae* presentan un tamaño de 4,7 μm de largo y 2,7 μm de ancho. Su filamento polar presenta entre 20-23 vueltas [14]. El proceso de germinación es similar al de *N. apis*.

Existe una gran contradicción con relación al papel que juega este parásito en el colapso de las colmenas. Muchos países han reportado su presencia como responsable de pérdidas de colmenas [61, 62], pero en otros países se considera que se encuentra en casi todas las colmenas pero no se lo relaciona con la mortandad de las mismas [63]. Por otro lado, están aquellos autores que afirman que *N. apis* continúa siendo más prevalente que *N. ceranae* [64,65]. En un estudio extenso en varios países de Europa se pudo determinar que la distribución de *N. apis* y *N. ceranae* y la intensidad de la infección variaban estacionalmente y regionalmente, pero que la pérdida de colonias solo estaba relacionada con la enfermedad en algunas regiones [66].

Con relación a los efectos que puede ocasionar este microsporidio tanto a nivel individual como de la colmena, se ha documentado que es promotora de forrajeos precoces [54, 55, 67], modifica los títulos de vitelogenina y la feromona mandibular en las reinas [68],

disminuye las funciones inmunológicas [69] y reduce la longevidad [70]. El mayor síntoma detectado es el estrés energético provocado por *N. ceranae* [71]. Se ha documentado que la presencia de *N. ceranae* altera la expresión proteómica en algunas porciones del intestino medio, responsables de la producción de energía, la regulación proteínica y la defensa antioxidante [72] lo que se traduce en un aumento del apetito de las abejas infectadas y una menor transmisión de alimento vía trofalaxia [73].

Se ha documentado en trabajos en laboratorio que los zánganos infectados con esporas de *N. ceranae* mostraron una disminución significativa en el volumen del semen y la concentración de espermatozoides, así como un mayor porcentaje de fragmentación del ADN espermático [74].

Co-infecciones

Las co-infecciones con ambas especies de *Nosema* spp. altera la nutrición, las vías metabólicas y hormonales, incluidas las vías de señalización de insulina. Otro de los efectos a nivel individual es el incremento en la producción de cierta feromona (etil-oleato) en las abejas infectadas con ambas especies de *Nosema* spp. [75].

Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la infección por *Nosema* suele ser difícil de determinar, ya que no presenta síntomas evidentes, excepto la diarrea en *N. apis*, pero que no constituye un síntoma patognomónico ni exclusivo de la infección por microsporidios [41].

Para poder estimar la parasitosis en la colmena, sigue siendo muy controvertido el tipo de abejas a utilizar. Hay quienes afirman que es importante determinar el grado de parasitación dentro de la colmena, utilizando abejas nodrizas para establecer el impacto de la infección en la colmena [83]. Por otro lado, las abejas extraídas de la piquera (abejas pecoreadoras) pueden informar sobre la mayor intensidad de la infección. Este último grupo etario de abejas es el más utilizado y reconocido para realizar el diagnóstico de la parasitosis [61, 83, 84, 85, 86].

Una vez obtenidas las muestras, principalmente de la piquera de la colmena, se llevan al laboratorio. Las técnicas utilizadas para diagnosticar la parasitosis son la microscopía óptica y técnicas moleculares, aunque éstas últimas suelen utilizarse principalmente con fines de investigación, ya que suelen ser muy costosas. La microscopía óptica, puede

confirmar la presencia de *Nosema* y estimar la intensidad de la infección mediante el recuento de esporos con hemocitómetro. Esta técnica tiene como desventaja que no permite diferenciar entre especies de *Nosema* spp. y sólo detecta esporas del parásito. Las técnicas moleculares son más sensibles que la microscopía óptica, pudiendo detectar infecciones a niveles muy bajos, amplifica el ADN de los estados vegetativos y de espora del parásito. De esta forma se puede determinar tanto la intensidad de la infección como las especies que están infectando [90]. Varios métodos se han desarrollado e implementado basados en PCR convencionales y en tiempo real para identificar especies de *Nosema* spp. [3, 39, 49, 65, 88, 89, 90, 91, 92, 93]. La mayoría se basan en la amplificación por PCR del gen 16S rRNA usando pares de cebadores de PCR específicos de las especies en cuestión, excepto el método de PCR dúplex descrito por Gisder y Genersch [91], que se dirige al gen de la ARN-polimerasa II dependiente de ADN.

Otra de las técnicas que tienen poco desarrollo, pero que pueden ser muy útiles en el futuro, son las pruebas de ELISA. Recientemente, Aronstein y sus colaboradores adaptaron la técnica de ELISA para detectar infecciones por *N. ceranae* [94, 95]. En un ELISA, un anticuerpo que es específico para una proteína u hormona de interés se acopla a un tinte y, por lo tanto, es posible determinar si una proteína u hormona objetivo está presente en la muestra y estimar visualmente sus niveles. Aronstein y sus colaboradores desarrollaron anticuerpos que se unen específicamente a la proteína de la pared de las esporas (SWP32) de *N. ceranae* e incorporaron estos en un ELISA. Este método requiere un equipo costoso para ser realizado, pero su desarrollo podría permitir su uso en el campo, mediante una varilla que contenga el anticuerpo específico, la intensidad de la infección podría estimarse comparando los resultados de color con una tarjeta de referencia proporcionada por el fabricante [95].

Otras técnicas poco desarrolladas hasta el momento se asocian a mediciones acústicas o de olores del estrés de colmenas. Se han puesto a prueba sistemas acústicos para detectar *Varroa* en las colmenas [96], lo que podría replicarse en el caso de *Nosema* spp. Algo similar se está estudiando para vincular la presencia de sustancias tóxicas u olores de enfermedades en las colmenas con señales acústicas [97]. Del mismo modo, se están analizando odorantes químicos, mediante el análisis de las feromonas [98] y si estudios futuros relacionan los niveles químicos con la presencia de *Nosema*, los perfiles volátiles se pueden usar como herramientas de diagnóstico.

Hasta el momento no se ha determinado un umbral de daño económico para las especies de *Nosema* que parasitan a la abeja melífera. Las obreras pueden transportar hasta decenas de millones de esporas, pero, como se señaló anteriormente, la presencia de parásitos no es una garantía de los síntomas de la enfermedad a nivel de la colmena [41,99]. Resta realizar estudios para vincular los niveles de *Nosema* con el daño de colmenas para que se puedan establecer pautas de tratamiento.

Tratamiento

Para controlar la Nosemosis, se conocen algunos tratamientos, como la fumagilina, los compuestos derivados de bacterias (surfactinas, ácidos orgánicos) o derivados de plantas (aceites esenciales [OE] y otros productos vegetales) con actividad fungicida y, potencialmente, el uso futuro de productos genéticos (interferencia de ARN, ARNi). Los compuestos antes mencionados alivian las infecciones graves a corto plazo inhibiendo las infecciones activas, pero no matan las esporas que contaminan las colmenas. Suele ser necesario la aplicación de más de un tratamiento, para prevenir la reinfección a causa de esporas residuales. Lo anterior puede llevar a seleccionar cepas de resistencia por las repetidas aplicaciones y ser sumamente costoso para los apicultores. Estos compuestos también pueden tener efectos negativos para las abejas. Solo se encuentra probada la eficacia de la fumagilina en múltiples ensayos a campo y en laboratorio, teniendo eficacias comprobadas en un corto periodo de tiempo, sin ser eficiente a largo plazo [2, 100, 101, 102]. La efectividad de los productos derivados de plantas o bacterias y el ARNi se ha estudiado principalmente en ensayos de laboratorio, con estudios de campo limitados hasta la fecha [103]. Se han estudiado surfactinas producidas por bacterias *Bacillus subtilis* aisladas de muestras de miel, comprobando que reducen el recuento de esporas de *N. ceranae* en obreras inoculadas en laboratorio [104]. Además, los ácidos orgánicos (lácticos) aislados de la bacteria *Lactobacillus johnsonii* reducen las cargas de esporas en el campo en conjunto con la fumagilina [105]. Varios aceites esenciales son eficaces para reducir las cargas de esporas de *Nosema* [106, 107]. El análisis comparativo del genoma de *N. ceranae* y *N. apis* condujo a la identificación de elementos genéticos específicos del parásito que están potencialmente relacionados con la virulencia, que podrían aprovecharse para desarrollar terapias basadas en ARNi contra las enfermedades de *Nosema* [108, 109].

Otra estrategia alternativa o complementaria para tratar el crecimiento vegetativo de los parásitos es inactivar las esporas ambientales mediante la esterilización. Calentar los cuadros y las cámaras que no están siendo utilizadas a 49° C durante 24 horas reduce las infecciones subsiguientes de *N. apis* [110] y, teóricamente, el calentamiento a altas temperaturas también podría matar las esporas de *N. ceranae*. Otros métodos incluyen la exposición a los rayos UV y la radiación gamma, los cuales han demostrado su eficacia para desactivar las esporas de *N. apis* en suspensión líquida [111].

Con relación a las prácticas de manejo, se ha documentado que la reproducción selectiva de abejas tolerantes a *N. ceranae* puede ser útil para sustentar la resiliencia al parásito [112, 113, 114]. También se ha documentado que las abejas africanizas tienen una resistencia natural al *N. ceranae* al compararlo con las abejas italianas [115]. Otras prácticas de manejo pueden ser el recambio frecuente de reinas y la suplementación proteínica [116, 117, 118].

Estudio de los factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos intentan identificar los factores que pueden explicar o contribuir a la aparición de una enfermedad [119] que, por lo general, es fenómeno multicausal [120]. Un factor de riesgo es aquel que incrementa la probabilidad de que se presente una determinada enfermedad o fenómeno de interés [119], pudiendo clasificarse en primarios o secundarios de acuerdo a la magnitud del efecto que producen sobre la ocurrencia de la enfermedad. Para el caso de los insectos sociales, las interacciones que se dan dentro de una colmena hacen que las patologías estén determinadas por una red compleja de interacciones que incluye múltiples factores asociados tanto a las colmenas como al ambiente [121]. Por otro lado, en especies manejadas por el hombre, como es el caso de *A. mellifera*, dicha complejidad aumenta.

La identificación de factores de riesgo que contribuyen a la presencia o el desarrollo de una enfermedad permitirá implementar programas de manejo eficientes para evitar o disminuir el desarrollo de una enfermedad. Para poder realizar la identificación de factores de riesgo se conducen estudios que permiten establecer la asociación existente entre la exposición a uno o más factores y la mayor intensidad en la presencia de un patógeno. Dichos estudio pueden ser tanto experimentales como observacionales.

En los estudios observacionales, se reconoce la ocurrencia o no del patógeno y se registran variables que están o estuvieron presentes en cada uno de los individuos analizados (exposición). Por otro lado, aquellos estudios que hacen un seguimiento de la población a lo largo del tiempo, son los que presentan un diseño longitudinal [122] mientras que aquellos estudios que determinan en un momento dado tanto el estado de la población con relación al patógeno y la exposición a factores potencialmente asociados a su presencia, se denominan transversales [119].

La identificación de los factores de riesgo asociados a la ocurrencia de una enfermedad permite diseñar medidas tendientes a controlarla y proporciona información para la implementación de campañas de control y erradicación efectiva de enfermedades.

Análisis espacial

Los estudios espaciales en epidemiología buscan identificar las variaciones espaciales en el riesgo de ocurrencia de una enfermedad, identificando ubicaciones (y, lo que es más importante, individuos) asociadas con un mayor riesgo de enfermedad [123]. La localización ha sido reconocida como un componente esencial en la ciencia epidemiológica [124]. Los patrones espaciales de la ocurrencia de una enfermedad pueden ser uniformes, aleatorios o agrupados (en *cluster*) [125]. Los métodos de agrupación espacial o *clusters*, son la herramienta más común para evaluar patrones espaciales no aleatorios. Estos métodos han superado ciertas limitaciones de otros métodos utilizados, presentando mejoras con relación a la potencia estadística, incluyendo situaciones en las cuales existen pocos casos detectados, alta variabilidad en la densidad de la población subyacente y el tamaño y forma de los *cluster* [126]. Los métodos “globales” para detectar *clusters* determinan si existe un agrupamiento evidente de los datos a lo largo de la región de estudio, sin identificar la ubicación de dichos *cluster*. Los métodos de detección “locales”, definen la ubicación y el tamaño de los *cluster* [127]. *Spatial scan statistic* es un test de detección de *cluster* que permite localizar el sitio y radio de cada *cluster*, así como testear su significancia estadística [125]. Consiste en generar múltiples círculos cuyos centroides se van desplazando a lo largo de la región de estudio. Para cada posición del centroide, el radio cambia y toma valores entre cero y un límite superior establecido por el investigador (como máximo 50% de toda la población). Se definen de esta manera los *clusters* potenciales, cada uno con diferente localización y tamaño. El test de radio de verosimilitud (*likelihood ratio test*) plantea como

hipótesis alternativa que existe al menos un círculo para el cual el riesgo de ocurrencia de la enfermedad es mayor dentro que fuera del mismo. Para ello, se comparan los casos observados sobre los casos esperados si la ocurrencia de la enfermedad presentara una distribución aleatoria [128, 129].

Abordaje de la presente tesis:

En Argentina se ha descripto la presencia de *N. ceranae*, sin embargo, la relación de dicha especie con *N. apis* y el impacto que causan ambas especies en la producción de miel y en la pérdida de colmenas es desconocido hasta el momento.

En las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa la actividad apícola se desarrolla con diferentes tipos de razas de abejas, diferentes manejos por parte de los apicultores y en diferentes ambientes con variaciones climáticas que constituyen un escenario ideal para determinar los factores que inciden en la ocurrencia de la Nosemosis.

La presente tesis busca realizar un análisis epidemiológico que permita identificar los factores que propician la ocurrencia de Nosemosis, evaluar el patrón de comportamiento estacional de la enfermedad y caracterizar genéticamente las poblaciones de *Nosema* spp. en diferentes ecosistemas de nuestro país, con especial énfasis en el estudio del impacto real de la Nosemosis sobre la producción de miel.

Hipotesis:

Las **hipótesis** planteadas en la presente tesis doctoral son:

- La Nosemosis es una enfermedad multifactorial cuyo impacto está asociado a la intensidad de la parasitosis, la especie de *Nosema* spp. actuante, de factores ambientales, de manejo de las colmenas y factores nutricionales y enfermedades concomitantes que solo o en combinación provocan estrés en las colmenas.
- La adopción de medidas de manejo sobre las prácticas apícolas asociadas con un mayor riesgo de presentación de la Nosemosis generará una reducción en la prevalencia de la enfermedad y una mejora en los parámetros productivos de las colmenas.
- Existe una asociación entre la subespecie de abeja y la especie de *Nosema* spp. que la parasita.

- La Nosemosis se presentará con mayor intensidad en colmenas emplazadas en regiones frías y húmedas, y con menor intensidad en regiones cálidas y secas.
- Prácticas de manejo como el recambio sistemático de reinas cada dos años reducen la ocurrencia de la parasitosis.

Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo fue identificar los factores de riesgo asociados a la presencia y difusión de la Nosemosis en diferentes regiones ecológicas del país cuyo control permita mantener colonias en buenas condiciones y de esta manera, optimizar la producción de miel.

Objetivos específicos

Los mismos son enunciados por capítulo:

Capítulo I: Caracterización de los ambientes mediante curvas de floración y técnicas de manejo apícola utilizadas en cada región agro-ecológica.

1. Determinar las características particulares de cada región analizada con relación a aspectos ambientales, climáticos y de manejo que realizan los apicultores en sus colmenas.

Capítulo II: Variación anual de la infección con *Nosema* spp. en colmena emplazadas en diferentes regiones agro-ecológicas

1. Analizar la variación mensual de la carga y prevalencia de esporos de *Nosema* spp./abeja de las colmenas a lo largo de un año de estudio en diferentes eco-regiones del país.
2. Determinar la relación entre la prevalencia y la carga de esporos de *Nosema* spp./abeja de las colmenas.

Capítulo III: Identificación de especies de *Nosema* spp. con relación a las regiones agro-ecológicas y a la diversidad genética de *A. mellifera*

1. Identificación de poblaciones de *Nosema* spp. presentes en apiarios de las regiones agro-ecológicas de Santa Fe, Chaco y Formosa.
2. Determinar los haplotipos de las diferentes poblaciones de *Apis mellifera* presente en los apiarios bajo estudio en las diferentes regiones agro-ecológicas.
3. Asociar los diferentes haplotipos de *A. mellifera* con las especies de *Nosema* spp. identificadas.

Capítulo IV: Identificación de factores de riesgo asociados a la presencia de *Nosema* spp. luego de la cosecha de miel.

1. Identificar los factores de riesgo asociados con colmenas con altas cargas de esporos *Nosema* spp./abeja de las colmenas en relación a las distintas variables analizadas en la etapa post-cosecha.

Capítulo V: Identificación de factores de riesgos asociados a la presencia de *Nosema* spp. en el ingreso a la invernada y al inicio de la primavera.

1. Identificar los factores de riesgo asociados con colmenas con altas cargas de esporos de *Nosema* spp./abeja en las colmenas en relación a las distintas variables analizadas en el otoño y al inicio de la temporada apícola (primavera).
2. Evaluar el impacto de la Nosemosis sobre la producción de miel y el estado de las colmenas.

**Capítulo I: Caracterización de los ambientes
mediante curvas de floración y técnicas de
manejo apícola utilizadas en cada región agro-
ecológica**

Introducción

La información de la región bajo evaluación en un estudio epidemiológico es esencial ya que brinda particularidades sobre el entorno donde se encuentran los individuos a analizar, sobre los propios individuos evaluados y sobre las técnicas utilizadas para determinar, en este caso, el estado de las colmenas [130].

Características del ambiente y las prácticas de manejo apícolas utilizadas

La presente tesis doctoral se desarrolló en la región Pampeana norte (provincia de Santa Fe) y el norte del país (provincias de Chaco y Formosa). Este territorio reúne diferentes ecosistemas, producciones agrícola-ganaderas y climas sub-tropicales y templados.

En la provincia de Santa Fe existen cerca de 4.000 productores con aproximadamente 500.000 colmenas (Departamento de Agricultura de Santa Fe, 2008). La provincia de Chaco presenta 1.200 productores y 75.000 colmenas, mientras que en la provincia de Formosa hay 750 productores con 19.000 colmenas [131]. En estas tres provincias, se identificaron cinco zonas de estudio (Santa Fe Sur, Santa Fe Centro, Chaco Húmedo, Chaco Transición y Chaco Semi-árido) de acuerdo con la clasificación de regiones agroecológicas en Argentina [132], la clasificación agroeconómica de la provincia de Santa Fe realizada por INTA [133] e informes de la RIAN [134] sobre las provincias de Chaco y Formosa.

La región Santa Fe Sur presenta clima templado y se caracteriza por una temperatura media anual de 16-18°C (16-31°C máxima y mínima registrada en el año de estudio) y precipitaciones de 600 mm suroeste y 1100 mm noreste anuales. El uso mayoritario de la tierra está destinado a cultivos de soja, seguidos por trigo y maíz, secundariamente pasturas de base alfalfa [133].

En la región de Santa Fe Centro el clima es templado, la temperatura media anual es de 17-18°C (18-36°C máxima y mínima en el año de estudio), con precipitaciones promedio de 800–900 mm anuales. El uso del suelo está destinado a la ganadería intensiva (tambo e invernada sobre pasturas de alfalfa), con participación agrícola de los cultivos de soja de segunda, trigo, maíz y girasol, en tierras con alta capacidad productiva [133].

La zona chaqueña (que comprende las provincias de Chaco, Formosa y noreste de Santa Fe) se dividió en tres regiones de acuerdo a gradientes de temperatura y humedad anuales

[135]. En la región de Chaco Húmedo el clima es sub-tropical húmedo-sub-húmedo, con precipitaciones superiores a 1100 mm anuales. La temperatura media anual es de 23°C (21-35°C máxima y mínima registrada en el año de estudio). Constituye un área deprimida surcada por numerosos ríos y riachos. En los albardones se desarrolla la actividad agrícola, generalmente con características de minifundio siendo el resto del área de aptitud ganadera, forestal o aprovechada para cultivos especiales como arroz [134].

En el Chaco de Transición el clima es sub-tropical sub-húmedo-húmedo. Las temperaturas medias anuales de 23-24°C (21,6-36°C máxima y mínima registrada en el año de estudio) con precipitaciones medias anuales de 1000 mm. La mayor parte de la zona se caracteriza por el uso agrícola de la tierra con explotaciones dedicadas al cultivo de cereales, oleaginosas y cultivos industriales (algodón), insertos en un sistema mixto donde la ganadería constituye la alternativa productiva [134].

La región del Chaco Semi-árido presenta clima sub-tropical semi-árido, con temperaturas medias anuales de 23°C (21,5-39,5°C máxima y mínima registrada en el año de estudio) y precipitaciones anuales de 550 a 900 mm. La actividad principal es la explotación forestal extractiva. La agricultura se ve limitada por el déficit hídrico. Además, el pastoreo de los suelos bajo monte constituye un sistema ganadero de baja eficiencia [134].

Para un correcto análisis de las prácticas de manejo apícola en la zona bajo estudio es preciso conocer las curvas de floración. Las mismas se obtienen registrando la evolución de la floración de las diferentes especies de una zona, considerando fundamentalmente el aporte de aquellas que tienen importancia apícola [136]. Las floraciones pueden ser intensas, producirse por cortos períodos de tiempo y ser de ocurrencia repentina. Por otro lado, las floraciones pueden ser suaves y continuas y de prolongada duración en el tiempo. Las floraciones van a condicionar el manejo productivo de la colonia, lo cual dará como resultado un aprovechamiento eficiente de los recursos florales [136].

En Argentina, en los climas tropicales, las colonias comienzan a desarrollarse prácticamente tres meses antes que las colonias en los climas templados. En los meses de junio-julio en clima tropical encontramos las colonias con características similares a como se pueden encontrar las colmenas de clima templado en primavera [136].

Con base en el Manual de Apicultura para Ambientes Subtropicales de INTA [136], se pueden determinar prácticas de manejo recomendables para los productores apícolas de

acuerdo a los diferentes climas donde se desarrolla la actividad y a las actividades particulares que realicen las abejas.

La gran variedad y cantidad de flores en los climas subtropicales, son favorables para que las colmenas realicen como principal actividad la multiplicación. De esta forma las abejas aprovechan más eficientemente la oferta de néctar y polen provista por el ambiente [136]. Lo que ocurre en climas templados es distinto, precisamente debido a las variaciones de temperaturas más marcadas y la disponibilidad relativa de flores. En este caso lo que comúnmente realiza la colmena es acumular reservas (miel) para llegar en mejores condiciones a la primavera [136].

Con base en estas diferencias marcadas entre los climas donde se encuentran las colonias que se analizaron en la presente tesis, los requerimientos deberían ser diferentes y del mismo modo los manejos por parte del productor.

Objetivo

Determinar las características particulares de cada región analizada con relación a aspectos ambientales, climáticos y de manejo que realizan los apicultores en sus colmenas.

Materiales y métodos

Con base en las diferencias climáticas y ambientales de las tres provincias bajo estudio se tuvieron en cuenta las regiones agro-ecológicas definidas previamente (Santa Fe Sur, Centro, Chaco Húmedo, de Transición y Semi-árido) para analizar las curvas de floración y las prácticas apícolas.

Encuestas de curvas de floración

Se realizaron encuestas semi-estructuradas a un total de 15 técnicos apícolas, que desarrollan su actividad como asesores en explotaciones apícolas de las regiones bajo estudio, para relevar los siguientes datos (*Anexo 1*): periodo anual de floración con especificación de entrada de polen y de néctar, momento (especificando al menos por mes o quincena) de finalización de cosecha de miel (bajada a cámara) y comienzo de tratamientos terapéuticos contra *V.destructor*, momento de desarrollo del nido de cría en las colmenas y aplicación de tratamientos post-invernales.

Encuestas de manejo

Por otro lado, se confeccionaron tres encuestas semi-estructuradas (Anexo 2, 3 y 4) que fueron implementadas en tres momentos del año, siguiendo el calendario apícola y en simultáneo con los muestreos de enfermedades en las colmenas (Capítulo 4 y 5). Dichas encuestas fueron realizadas en el momento de la bajada a cámara (Pre-tratamiento), momento clave para realizar algún tratamiento acaricida contra *V. destructor*, debido a que las colmenas ingresarán a la invernada y deberían encontrarse libres de parásitos o con la menor carga posible. El segundo muestreo se realizó aproximadamente 45 días luego de la bajada a cámara, debido a que en la mayoría de las regiones agro-ecológicas analizadas se aplica un tratamiento y el período de permanencia dentro de la colmena de las tiras conteniendo el acaricida suele ser entre 42 - 45 días. El último muestreo se realizó cuando comenzó a producirse el ingreso del flujo de néctar dentro de la colmena (Inicio de temporada).

Todos los momentos de muestreo fueron determinados en cada región con base en las encuestas de curvas de floración. Estas encuestas se realizaron a un total de 65 apicultores para determinar las técnicas de manejo más utilizadas en cada región agro-ecológica. Los apicultores participantes respondieron en el primer muestreo (Post-cosecha) un cuestionario que incluía preguntas sobre el número de colonias, suplementación con carbohidratos y dietas proteicas, monitoreo de los niveles de ácaros en las colonias medidos por los apicultores, reemplazo de reinas, fabricación de núcleos, trashumancia, tratamiento contra *Varroa* (frecuencia de la aplicación de tratamientos), etc. Durante la segunda visita, los apicultores proporcionaron información adicional sobre el tratamiento en particular durante el otoño de 2015 (producto, fecha, etc.). Durante la última visita, los apicultores respondieron sobre el manejo del invierno. Dependiendo de la región geográfica, la fecha para la evaluación de primavera varió entre los apiarios, estableciendo esta visita inmediatamente después de que comienza el flujo de néctar.

Análisis estadístico

Para describir las diferentes variables en cada región se determinaron las proporciones en relación a las respuestas proporcionadas por los apicultores y se confeccionaron gráficos en base a dichas variables por región. Por otro lado, se analizaron mediante X^2 la relación

entre la categorización de las variables y las distintas regiones analizadas. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat.

Resultados

Curvas de floración (Anexo 1)

En las regiones de Santa Fe, tanto Sur como Centro, se pudo observar una reducción marcada en la disponibilidad de néctar y polen durante los meses de mayo, junio y julio. Por otro lado, en los meses de noviembre, diciembre y enero se observan los mayores flujos de néctar y polen (Figura 1).

Las tres regiones agro-ecológicas de Chaco (Húmedo, de Transición y Semiárido) presentan dos baches marcados con relación a la disponibilidad de néctar y polen, con distinta intensidad. Por un lado, ocurre una reducción durante los meses de diciembre y enero, mientras que durante los meses de mayo, junio y julio se sucede otra disminución. En los meses de febrero y marzo suele observarse en estas regiones un aumento significativo del flujo de néctar y en los meses de octubre y noviembre se observa el mayor flujo de néctar (Figura 1).

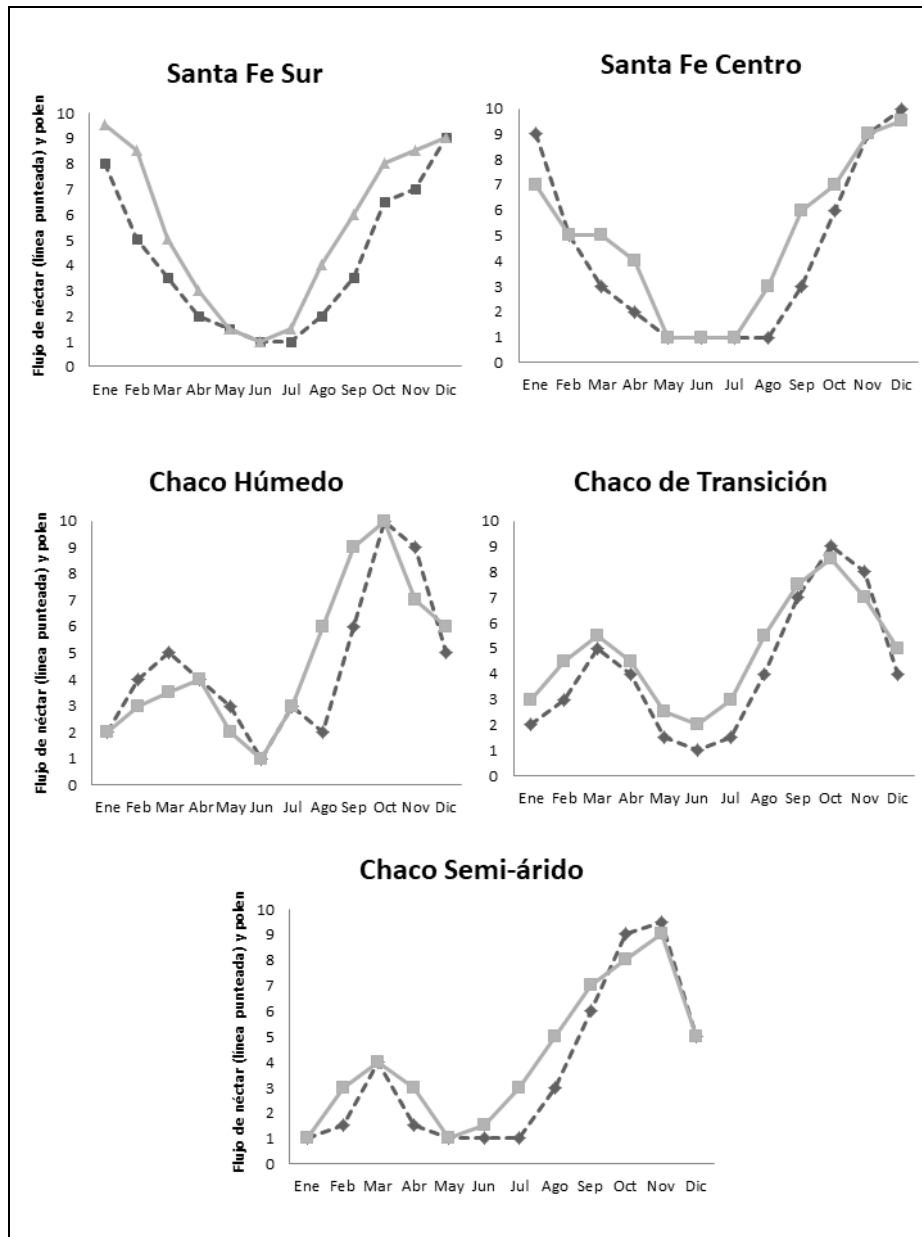


Figura 1. Curvas de flujo de néctar (línea punteada) y polen (línea entera) en las diferentes regiones agro-ecológicas bajo estudio.

Las encuestas realizadas a los apicultores arrojaron resultados sobre el calendario apícola en las diferentes regiones agro-ecológicas (Tabla 1). Se pudo observar que existen ciertas variaciones con relación al ingreso de néctar, reflejado particularmente entre las regiones de Santa Fe (Sur y Centro) en comparación con las regiones de Chaco (Húmedo,

Transición y Semi-árido). De tal forma, las regiones de Chaco presentan dos momentos de cosecha de miel, entre noviembre-diciembre y marzo-abril.

Tabla 1. Calendario apícola en las diferentes regiones agro-ecológicas.

Regiones agro-ecológicas	Inicio de postura	Mayor ingreso de néctar	Cosecha	Tratamiento post-cosecha
Santa Fe Sur	Agosto-Septiembre	Noviembre-Diciembre	Febrero	Febrero-Marzo
Santa Fe Centro	Agosto	Noviembre-Diciembre	Marzo-Abril	Marzo-Abril
Chaco Húmedo	Agosto	Octubre-Diciembre	Noviembre Febrero-Marzo	Marzo-Abril
Chaco de Transición	Julio-Agosto	Septiembre- Octubre-Noviembre	Diciembre Abril	Enero Abril
Chaco Semi-árido	Julio	Septiembre- Octubre-Noviembre	Noviembre Abril	Diciembre Abril

Encuestas de manejo (Anexo 2)

De los datos aportados por las encuestas se realizó una breve descripción por regiones agro-ecológicas sobre las características de los apiarios analizados. Los muestreos se realizaron teniendo en cuenta las curvas de floración, los momentos claves en el desarrollo de la colmena. El primer muestreo seguido de la aplicación de la encuesta 1, fue realizado post-cosecha, donde las abejas suelen sufrir un gran estrés debido a la modificación provocada por la extracción de miel. El segundo muestreo, seguido también por la encuesta 2, se realizó aproximadamente 45 días posteriores al primer muestreo, coincidiendo con el momento que las colmenas comienzan a bloquearse, el nido de cría se reduce, previo al ingreso a la invernada. Por último, el último muestreo se realizó al comenzar la temporada apícola, lo que determina el estado en que las colmenas salen de la invernada e inician el proceso productivo.

En algunas respuestas se realizó una re-categorización de las mismas para obtener información con relación a lo que es recomendado por el Manual Apícola para Ambientes Subtropicales de INTA [136]. Una de las respuestas re-categorizada fue la correspondiente al tipo de vegetación presente en los alrededores de los apiarios muestreados. En función de las respuestas aportadas por los apicultores, se decidió re-categorizar la variable en tres posibles respuestas. Cuando los apicultores identificaban en los alrededores de sus apiarios la existencia de especies de monte (chañar, algarrobo, eucaliptus, paraíso, etc.) y especies propias de pastizales (tréboles, viznaga, cardo, siempre verde, pastura, etc.) nos referimos a Monte y Pastizal. Cuando en la descripción se incluía una combinación de especies vegetales típicas del monte y pastizales con especies cultivadas (maíz, soja, girasol, etc.), la variable fue nombrada como Monte y Cultivo. Finalmente, cuando los apicultores solo pudieron identificar especies cultivadas nos referimos a Cultivo.

Se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre las distintas regiones analizadas con respecto a la vegetación que circundaba los apiarios. En la región Santa Fe Sur, el mayor porcentaje de las colmenas donde se realizaron los muestreos se encontraban rodeadas por monte y pastizal (60%), seguidas por colmenas ubicadas en zonas rodeadas por cultivo en un 27,5%. En la región Santa Fe Centro, la mayor proporción de colmenas se ubicaron en ambientes que presentaban algún tipo de cultivo (70%). Las regiones de Chaco Húmedo y de Semi-árido presentaron un alto porcentaje de sus colmenas rodeadas por monte y pastizal y monte y cultivo, con una pequeña proporción de ambientes solo de cultivo. La región de Chaco de Transición no presentó colmenas rodeadas por cultivos.

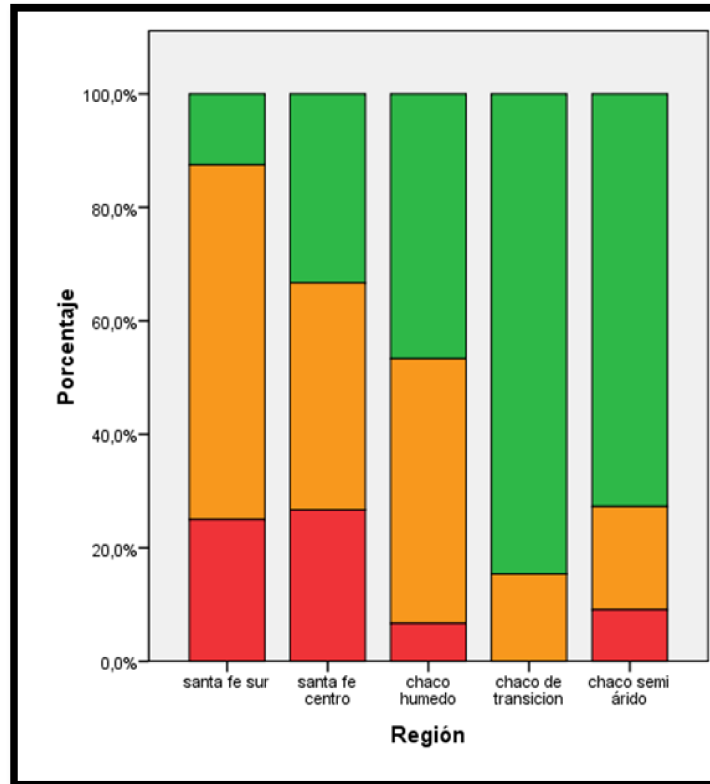


Figura 2. Porcentaje de colmenas en las diferentes regiones agro-ecológicas ubicadas en diferentes ambientes: monte y pastizal (verde), monte y cultivo (naranja), cultivo (rojo).

Para dimensionar el tamaño de las explotaciones apícolas, a los productores se les solicitó que indicaran la cantidad de colmenas que tenían sus apiarios. En general, en las diferentes regiones se observó que los apiarios se encontraban representados en su mayoría por menos de 50 colmenas, sin embargo, se encontraron diferencias significativas al analizar las distintas regiones ($P < 0,001$). Los apiarios con menor cantidad de colmenas se encontraron en Santa Fe Sur, con un promedio de 29 colmenas (entre 6 y 63 colmenas/apiario), seguidos por las tres regiones de Chaco con 34 colmenas en promedio (de 20 a 80; de 20 a 60 y de 8 a 57 colmenas/apiario, para Chaco Húmedo, de Transición y Semi-árido, respectivamente). Por otra parte, los apiarios del Centro de Santa Fe fueron los más grandes con 57 colmenas en promedio (de 13 a 163 colmenas/apiario) (Figura 3).

En un 50% de los casos encuestados los apicultores indicaron que la actividad apícola era su actividad secundaria, el resto de los encuestados lo consideraban como su actividad

primaria o con fines educativos o investigativos encontrando diferencias significativas entre las regiones analizadas ($P < 0,001$), siendo el 60% de los apicultores del Chaco Húmedo los que indicaron la apicultura como actividad primaria.

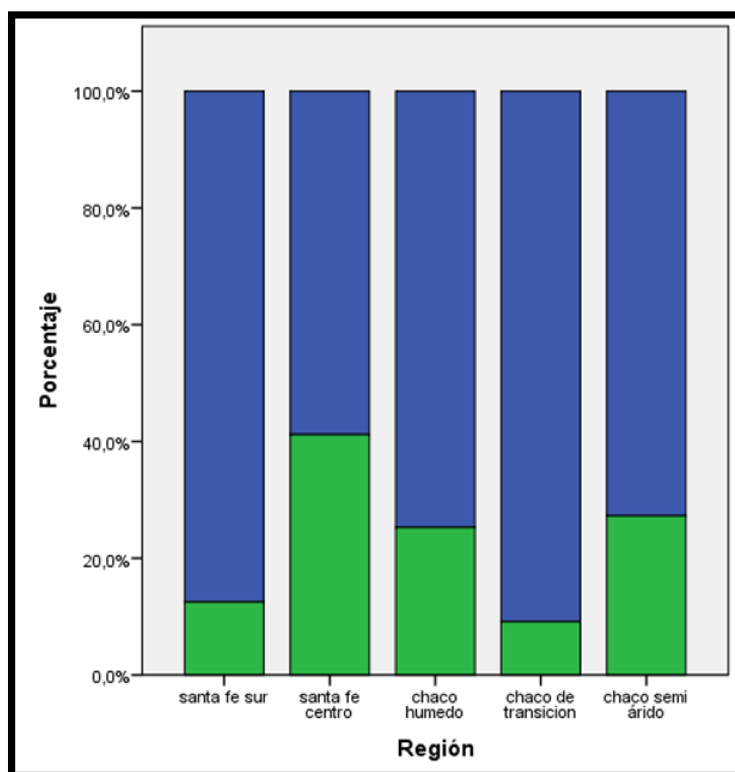


Figura 3. Porcentaje de apiarios con menos de 50 colmenas (azul) y con 50 o más colmenas (verde) por región agro-ecológica.

En la Figura 4 se presentan los resultados derivados de las encuestas relacionados con la suplementación polivitamínica que los apicultores declararon realizar como parte de sus prácticas habituales de manejo. Se encontraron diferencias significativas en el uso de los polivitamínicos entre regiones ($P < 0,001$). En general, se puede observar que el uso de polivitamínico no fue una práctica muy extendida entre los apicultores encuestados (entre 10 y 25% lo aplican), con excepción de la región Santa Fe Sur, donde cerca de un 60% indicó que aplicaban polivitamínico en sus colmenas.

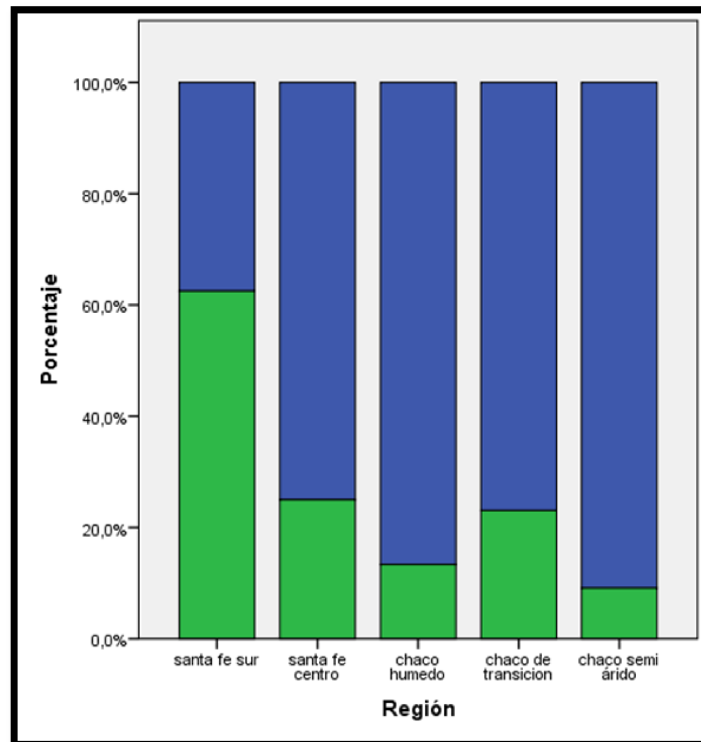


Figura 4. Porcentaje de apiarios alimentados con suplemento polivitamínico en las regiones agroecológicas analizadas. Suplementación con polivitamínico si= verde, no=azul.

Otra de las variables analizadas fue la suplementación con polen. El **polen natural** no ha sido utilizado en las distintas regiones, excepto en el Chaco Semi-árido en muy baja proporción (menos de 10%) a diferencia de las **tortas de polen** que se encontró más extendido su uso en las distintas regiones agro-ecológicas. Este tipo de suplemento se diferencia entre aquellos que lo realizan de manera propia y los que compran la torta elaborada de manera comercial. Del total de productores que indicaron utilizar la torta como suplemento un 31% indicó que compraba el suplemento comercial y el 69% restante elabora sus tortas. Chaco Húmedo fue la región en la que más apicultores indicaron que suplementaban con tortas de polen, con más de 50% de los apiarios utilizando esta práctica (Figura 5). Al preguntar sobre el uso del suplemento, también fue consultado el momento de aplicación. La adopción de esta práctica estuvo dividida en partes iguales

entre aquellos que respondieron que lo aplicaban cuando consideraban que era necesario y aquellos apicultores que lo aplicaban de manera rutinaria todos los años.

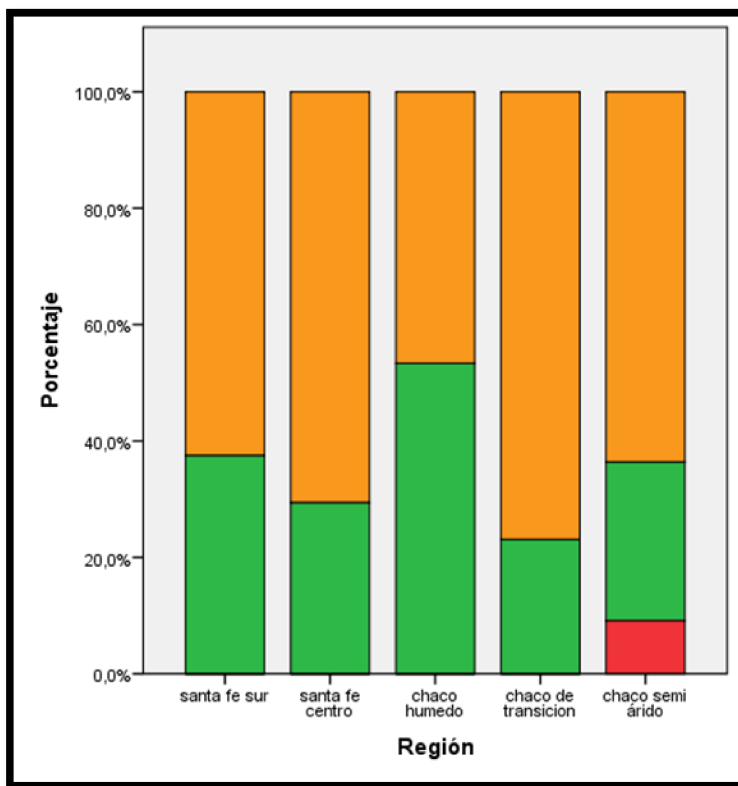


Figura 5. Porcentaje de apiarios que suplementan con variantes de polen en las regiones. No suplementa=amarillo, torta=verde, polen natural=rojo.

Para reducir el nido de cría en las épocas invernales, la suplementación artificial de alimento hace que las abejas acopien alimento dentro de la colmena sin la necesidad de buscarlo en el exterior y propician la reducción del nido de cría y el aumento de las reservas para las épocas desfavorables. Esta actividad es una práctica muy extendida entre los apicultores de las regiones de Santa Fe y Chaco Húmedo, siendo suministrada en forma concentrada (2:1= dos partes de azúcar: una parte de agua) (Figura 6). Para el caso de las regiones de Chaco de Transición y Semi-árido algunos apicultores no realizan dicha práctica o realizan el suministro de jarabe de forma diluida, bloqueo 1:1 (una parte de azúcar: una parte de agua). El bloqueo se realiza en su mayoría con jarabe de azúcar (92%), aunque en la región de Santa Fe Sur los apicultores indicaron que utilizaban jarabe

de maíz de alta fructosa en un 12% de las colmenas analizadas. Por su parte, en la región de Chaco Semi-árido los encuestados indicaron que utilizaban solo miel en 9% de las colmenas analizadas. El 8% y 9% de las colmenas ubicadas en las regiones Chaco de Transición y Semi-árido utilizaban jarabe y miel, respectivamente.

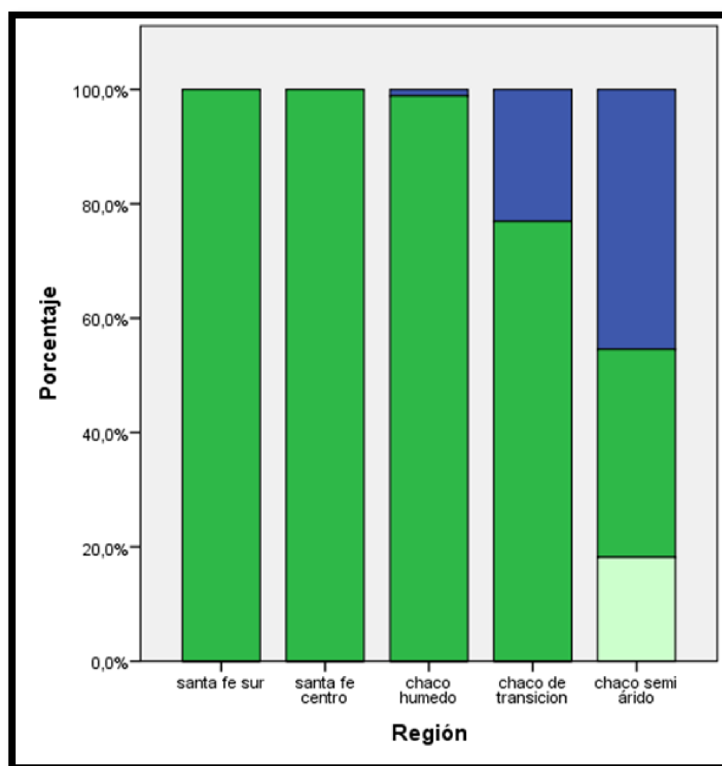


Figura 6. Porcentaje de apicultores que indicaron el uso de bloqueo de cámara, no realiza bloqueo = azul, realiza bloqueo 2:1 = verde, realiza bloqueo 1:1 = celeste.

La Figura 7 describe la práctica de recambio de reinas realizada por los apicultores. En función de las respuestas, esta variable fue re-categorizada en dos grandes grupos: aquellos apiarios que no recambian reinas o lo realizan cada más de dos años, contra aquellos que realizan recambio de reinas cada uno o dos años (práctica recomendada). Con relación a dicha variable, un alto número de apicultores indicaron que no realizaban recambio o lo realizan cada más de dos años. Se puede observar en la Figura 7 que el porcentaje de apicultores que indicaron que realizan recambio anual o bianual no llega a

50% en ninguna de las regiones, se encontraron diferencias significativas entre las regiones ($P=0,002$), siendo las colmenas de Chaco de Transición la región con mayor porcentaje (46%) de recambio cada dos años o menos, esta práctica es sumamente importante para mantener el buen estado general de la colmena

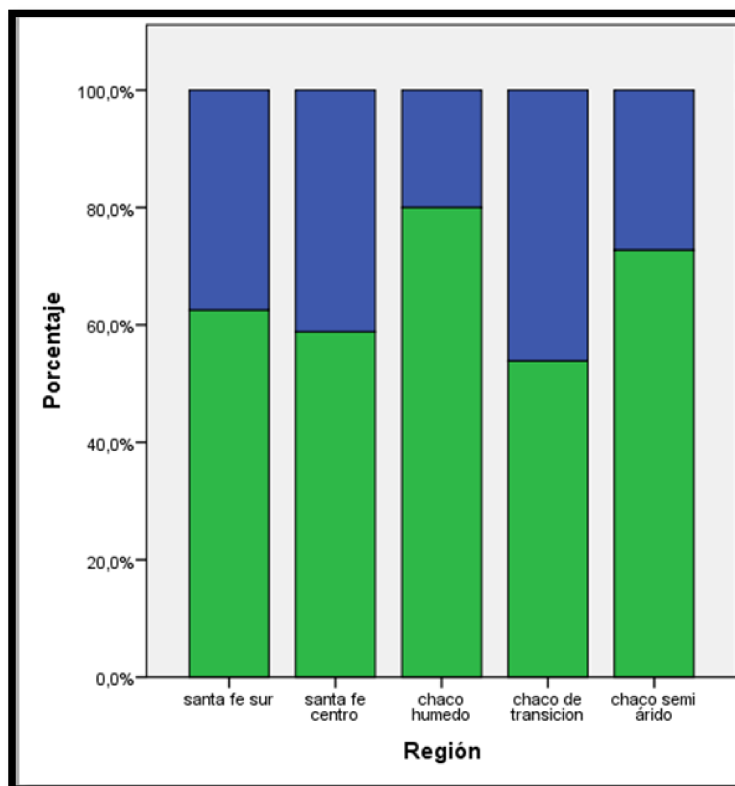


Figura 7. Porcentaje de apicultores que realizan con distinta frecuencia el recambio de reinas en las regiones. Azul= recambio de reinas cada uno o dos años, verde=recambio de reinas cada más de dos años o no se realiza.

En la Figura 8 se presenta el resultado de las respuestas indicadas por los apicultores con relación a la multiplicación de colmenas, una práctica que, en términos generales, es realizada por la mayoría de los apicultores sin importar la región agro-ecológica donde se encontraban sus apiarios. Sólo una pequeña proporción de apicultores localizados en las regiones de Chaco no realizan multiplicación (5% en Chaco Húmedo, 8% en Chaco de Transición y 20% en Chaco Semi-árido).

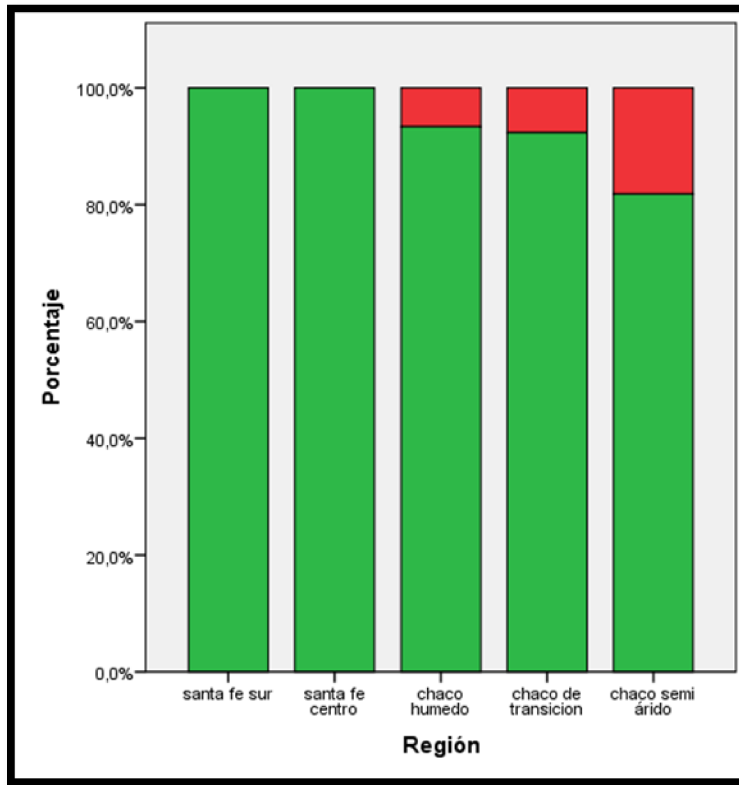


Figura 8. Porcentaje de apiarios que realizan multiplicación en las regiones agro-ecológicas. Verde= realiza multiplicación, Rojo=no realiza multiplicación.

Otra de las variables descritas fue la referida al recambio de cuadros negros (viejos) en las colmenas, la cual presentó variaciones significativas entre las regiones analizadas ($P < 0,001$). En el Centro de Santa Fe se encontró que era una práctica extendida entre la mayoría de los apicultores encuestados, seguido por la región de Chaco Húmedo. En la región Santa Fe Sur el 50% de los apicultores realizaban recambio anual de tres cuadros o más. Lo anterior contrasta con las regiones de Chaco de Transición y Semi-árido donde menos de la mitad lo practicaban de manera habitual (Figura 9).

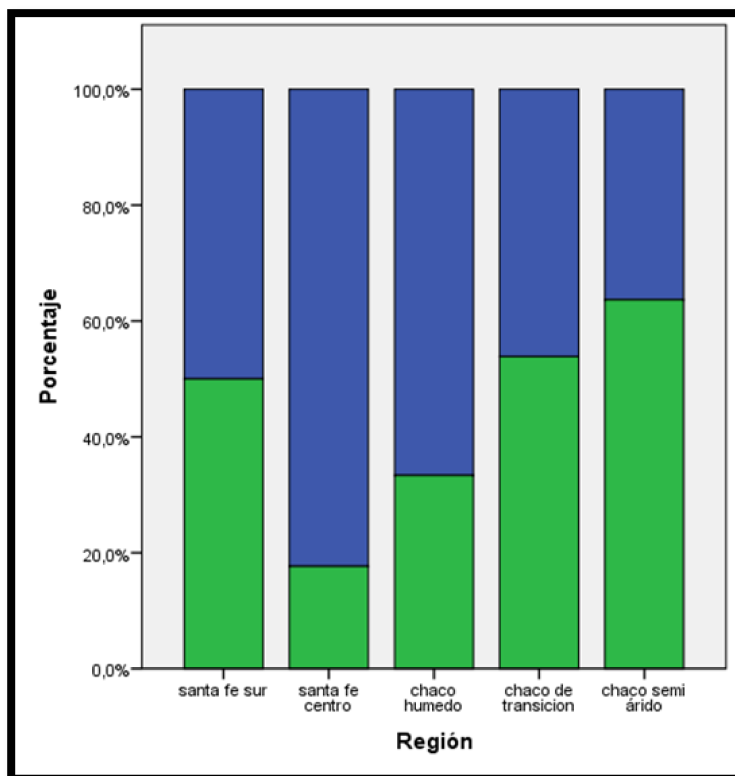


Figura 9. Porcentaje de apiarios que realizaban recambio de cuadros negros, asociada a las regiones agro-ecológicas. Azul=recambia 3 o más cuadros, verde= menos de 3 cuadros o ninguno.

La consulta sobre la ubicación de las colmenas dentro de los apiarios (Figura 10) permitió determinar que las regiones de Chaco no presentaban colmenas bajo sol directo. Esto está altamente influenciado por el clima imperante en ese tipo de regiones donde las altas temperaturas impiden esta ubicación, siendo más habitual ubicarlas bajo árboles de hojas perennes que cubran las colmenas del sol durante todo el año. Para el caso de las regiones de Santa Fe, se observó en el Sur colmenas ubicadas tanto al sol directo como bajo árboles de hojas caducas. Lo anterior también puede deberse al clima característico de la región lo que favorecería el desarrollo de la colmena en épocas frías y las protegería en las épocas cálidas. Para la región del Centro de Santa Fe, las colmenas se encontraron ubicadas en proporciones similares en las diferentes variantes (sol directo, hojas caducas y hojas perennes).

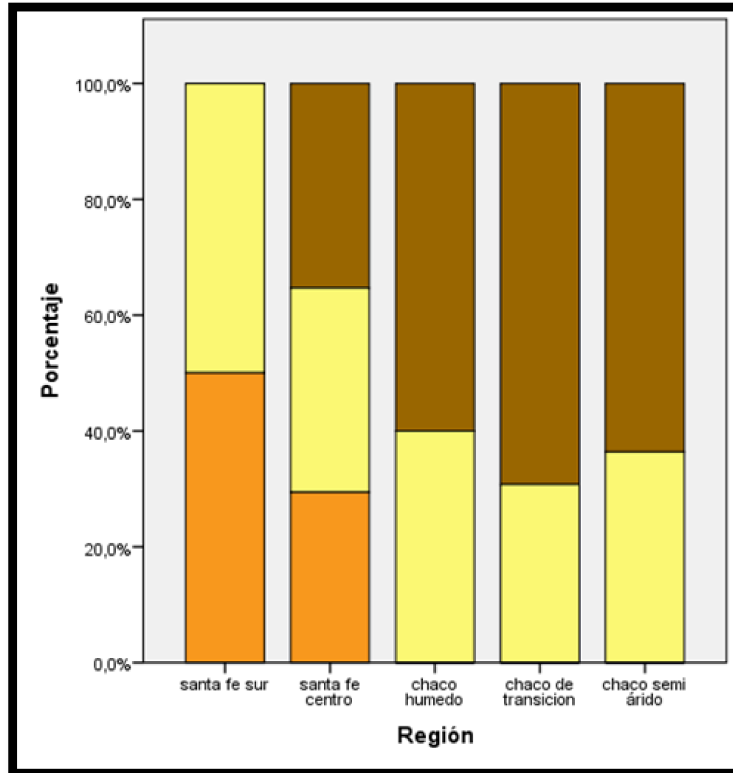


Fig. 10. Porcentaje de apicultores que indicaron tener sus colmenas ubicadas bajo hojas perennes (marrón), hojas caducas (amarillo), sol directo (naranja).

Otra de las prácticas analizadas fue el uso de poncho, elemento que se utiliza para resguardar a las colmenas del frío en el invierno. Comúnmente se emplean bolsas plásticas para cubrir la región del nido de cría. Se observaron diferencias significativas en el uso de poncho entre las diferentes regiones analizadas ($P < 0,001$). Es una práctica extendida en la mayoría de las regiones evaluadas (aproximadamente el 40% - 60% de los apicultores lo adopta), siendo el Sur de Santa Fe la región con mayor uso entre los apicultores encuestados (62,5%). Por otro lado, en Chaco Húmedo menos del 20% de los apicultores lo emplea.

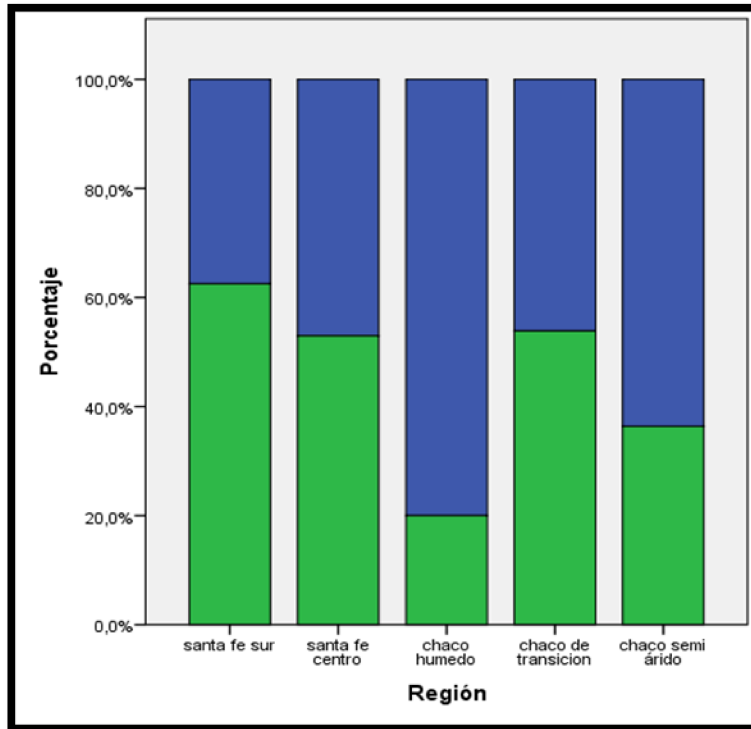


Fig. 11: Porcentaje de apicultores que indicaron el uso de poncho en sus colmenas, usa poncho = verde, no usa poncho = azul.

Discusión

Los resultados de las encuestas brindaron información sobre la implementación de las prácticas de manejo que realizaban los apicultores en las distintas regiones agro-ecológicas. En términos generales, las encuestas aportaron información que permite diferenciar las regiones en función de curvas de floración, así como también con relación a las prácticas de manejo que los apicultores que participaron de este trabajo realizan en sus colmenas.

Al analizar las curvas de floración fue posible diferenciar las regiones de Santa Fe Sur y Centro, donde se distingue una reducción importante en el flujo de néctar y polen principalmente en la época invernal (mayo-agosto). Lo anterior contrasta marcadamente con lo que ocurre en las regiones de Chaco Húmedo, de Transición y Semi-árido, donde existe una disminución marcada en el ingreso de polen y néctar en la época invernal, pero el mismo no se extiende por largos períodos de tiempo, sino que se reduce a uno o dos

meses. También se pudo observar en las tres regiones de Chaco una reducción aparente en la época estival, principalmente en el mes de enero. Esta situación se debe a las altas temperaturas que se registran en dichas zonas en los meses de diciembre y enero, lo cual provoca una reducción en la disponibilidad floral. El clima influye en el desarrollo de las flores y en la producción de polen y néctar, teniendo efecto directo en la actividad de las abejas y en el desarrollo de las colonias [143]. El efecto de la disponibilidad de alimento para el desarrollo de las colmenas se refleja en la sanidad de las mismas y puede ser un factor clave para la instalación y proliferación de ciertos patógenos que compiten con las abejas por el alimento obtenido. [144].

Del mismo modo, con relación al punto antes mencionado, podemos señalar, por un lado, que una mayor parte de los apiarios que se encuentran en las regiones de Santa Fe están dispuestos en ambientes rodeados por monte y cultivo contrastando con la baja proporción de apiarios que se ubican en monte y pastizal. Lo anterior se diferencia marcadamente con lo que ocurre con los apiarios en las regiones de Chaco, donde la proporción de apiarios en zonas de monte y pastizal es mayor. Este aspecto tiene ciertas implicancias en el desarrollo de las colmenas, principalmente con relación al tipo de alimento disponible en el ambiente para las abejas. En las regiones con monte y pastizal existe mayor diversidad de especies florales, lo que repercute en una mejor nutrición por el aporte de diferentes vitaminas y minerales provistos por el alimento. Las abejas dependen completamente de las plantas con flores como fuente primordial de polen y néctar, las abundancias más altas de abejas se correlacionan con ambientes que presentan mayor diversidad de plantas y, por lo tanto, mayor diversidad de fuentes de alimento [139].

Se ha detectado en estudios realizados en abejas sociales sin aguijón, que las colonias se encuentran más fuertes y las poblaciones crecen más rápidamente en entornos con mayor diversidad floral debido a un suministro continuo de recursos alimenticios. Los autores de dicho trabajo indicaron que el efecto positivo de la diversidad de plantas fue probablemente impulsado por la disponibilidad continua de recursos y, por lo tanto, una mayor cantidad de alimentos a lo largo del tiempo [140]. La alta diversidad de plantas ofrece una gama más amplia de fenologías de floración, proporcionando así un suministro continuo de recursos florales a lo largo de las temporadas que pueden salvar los periodos con una disponibilidad de alimentos baja [141, 142]. Por otro lado, el avance de la frontera agrícola (ampliamente observado en las regiones del Centro y Sur de Santa Fe) provoca una reducción marcada

en la disponibilidad de flores en el ambiente, lo que se traduce en problemas nutricionales para las abejas. A su vez, el modelo productivo actual, trae aparejado el uso de agroquímicos que pueden tener efectos adversos sobre la salud de las abejas [143].

Los climas de cada una de las regiones analizadas determinan la mayor disponibilidad de recursos florales en cada una de las regiones agro-ecológicas estudiadas. Las regiones de Chaco se encuentran en clima subtropical, caracterizado por una gran variedad y cantidad de flores. En este tipo de climas la colonia tiene como actividad principal la multiplicación, aprovechando la oferta de néctar y polen del ambiente. Las colonias adaptadas a climas tropicales disminuyen parcialmente su actividad en las épocas de lluvia. Después de la principal mielada, que se produce a fines del invierno y principios de la primavera, la entrada de néctar en climas tropicales es muy irregular. Se alternan momentos de escasez con cortos períodos de abundancia de néctar, además de producirse grandes variaciones de la disponibilidad de flores en áreas pequeñas [136]. Por otro lado, las regiones de Santa Fe se caracterizan por un clima templado con mayor variabilidad en las temperaturas a lo largo del año y menor disponibilidad floral. En este caso, las colmenas se desarrollan para acumular reservas (miel) y pasar de manera favorable los inviernos fríos. Las reducciones en la disponibilidad floral, provocadas por variaciones estacionales, generan desbalances en las colonias. Abejas que nacen en otoño, en climas templados, deben pasar todo el invierno en el interior de las colonias y son el sostén de las mismas en la primavera. La falta de reservas en las épocas de otoño tiene efecto directo en el desarrollo de las abejas, lo que podría debilitar el sistema inmunológico, haciéndolas más susceptibles a los patógenos y acortando su vida útil [137].

Los momentos donde se produce alguna reducción en la disponibilidad de recursos florales es clave para la implementación de técnicas de manejo, ya sea con la suplementación de algún producto nutricional para mejorar el aporte del ambiente, como así también para el control y prevención de enfermedades, mediante muestreos que determinen los niveles de parasitación y el posterior uso de productos aprobados en los casos que sea necesario. Uno de los aspectos abordados por la encuesta se refirió a la alimentación artificial, que corresponde al suministro de sustitutos de miel y/o polen en las colonias. Dichos sustitutos, cumplen la función de sostener las colonias cuando el alimento es insuficiente en el ambiente y también puede utilizarse para estimular las colonias en los momentos en los cuales el aporte natural es escaso y se generan condiciones nutricionales favorables para

el desarrollo temprano de la colonia. Mejorar la nutrición general de la colonia puede ayudar a las abejas a enfrentar múltiples estresores abióticos y bióticos [144]. Tortas de polen suelen emplearse de forma eficiente para suplir las faltantes naturales y suelen tener un alto contenido proteico (20%), del mismo modo los suplementos polivitamínicos intentan reconstituir las deficiencias de polen en las colonias [136].

Con relación a las características ambientales mencionadas previamente de las regiones analizadas cabría esperar que las regiones de Chaco presenten menor uso de suplementos de polen y miel debido al aporte natural. Sin embargo, se observó que se utilizaban dichos sustitutos en todas las regiones. Por ejemplo, aproximadamente el 50% de los apicultores que realizan su actividad en la región del Chaco Húmedo utilizaban suplementos de polen. Lo anterior estaría indicando que, aunque suelen ser ambientes con mayor diversidad floral, existen momentos que requieren el aporte de un suplemento para incentivar las colonias. En sentido inverso a lo que veníamos señalando, se ha demostrado, en un trabajo realizado con abejas sociales sin aguijón, que la diversidad de recursos disponibles en un ambiente no se correlaciona necesariamente con un alto contenido de nutrientes para las abejas [145].

Gran variedad de estudios han aportado información sobre el papel de los suplementos de polen (o suplementos de proteínas) en la salud y la longevidad de las abejas obreras [112, 146]. Dietas poliflorales exhiben en las abejas niveles constitutivos más altos de glucosa oxidasa, una enzima con propiedades antimicrobianas, en comparación con las abejas alimentadas con dietas monoflorales [147]. Por otro lado, se ha demostrado la reducción de las infecciones por el virus de alas deformes [148], las detoxificaciones por vías moleculares [144, 149], debidas al suplemento de polen multifloral. Otros de los efectos positivos derivados de la suplementación proteica se han reflejado en las cargas de esporos de *Nosema* spp. En trabajos realizados en laboratorio, al alimentar las abejas con dietas con proteínas (polen corbicular, polen ensilado, sustituto de polen u otra proteína o suplemento vitamínico) se observó una mayor longevidad de las abejas en contraposición a lo observado cuando las abejas fueron alimentadas solo con agua y azúcar [116, 117, 150, 151, 152]. Estos estudios sugieren que una buena nutrición mejora la capacidad de las abejas para tolerar en lugar de resistir (suprimir activamente) la infección con *N. ceranae* [153]. El uso de los suplementos, como se indicó anteriormente, puede ser sumamente beneficioso para la producción y sanidad apícola. Sin embargo, las formas de

administración, los momentos de aplicación y las cantidades pueden modificar su efectividad y tener efectos adversos para la sanidad en la colmena. Como se analizó en el presente trabajo, la implementación de esta técnica se da en regiones que posiblemente no estén requiriendo de su uso, pero ha sido replicada por desconocimiento. Esto puede acarrear consecuencias relacionadas a ciertas enfermedades que pueden hacerse más propensas como ha sido documentado en algunos trabajos para el caso de la *Nosema* spp. que suele aumentar sus niveles de infección al incorporar polen en la dieta de las abejas [116, 117]. En otro trabajo realizado en Uruguay, se determinó que la disponibilidad de diversos orígenes botánicos producto de las reservas de la propia colmena y la suplementación en momentos particulares del año produce una reducción en los niveles de infección [243].

Otra técnica relacionada con la suplementación que está extendida, a partir de los resultados del presente estudio, es el uso de tortas realizadas por los mismos apicultores. El origen de la aplicación de este tipo de suplemento puede estar basado en el desconocimiento por parte de los apicultores sobre impacto nutricional de las mismas. Es posible también que las cantidades colocadas en las colmenas no sean las apropiadas y no cumplan con la función de nutrir, ya sea por contener poca cantidad o porque el contenido proteico del polen utilizado no sea óptimo.

El bloqueo de la cámara de cría al inicio del otoño puede mejorar la condición de almacenamiento para el nuevo ciclo productivo e incrementa la acumulación de reservas corporales [136]. En las regiones de Santa Fe, esta fue una práctica muy extendida que favorece el mantenimiento de la colonia en épocas frías. En las regiones de Chaco esta práctica se realizaba, pero con menor frecuencia dada las condiciones más benignas de los inviernos en dichas regiones. Sin embargo, dado el efecto en la reducción del nido de cría al realizar el bloqueo, es posible que las colmenas en las regiones de Chaco permanezcan durante todo el año con una gran cantidad de celdas de cría, lo que podría generar el desarrollo de algunos patógenos, como es el caso de *V. destructor*. La reproducción de dicho parásito se produce dentro de las celdas de cría. Ha sido documentado que el desarrollo de colmenas con gran cantidad de cría en la época invernal propicia el desarrollo de dicha parasitosis [154].

Otra de las consultas realizadas en las encuestas sobre el número de colmenas que presentan los apiarios de los productores, dio como resultado que, en su mayoría, son

productores de bajo número de colmenas (menos de 50 colmenas por apiario). Solo la región del Centro de Santa Fe presentó un poco más de 40% de productores que consignaron poseer apiarios con más de 50 colmenas. El hecho de tener apiarios con menor número de colmenas suele ser una práctica extendida en las regiones analizadas. Lo anterior permite a los apicultores ser eficiente en el uso del tiempo y en los viajes para control y trabajo en las colmenas [136]. Por otro lado, una gran proporción de los apicultores encuestados indicaron a la apicultura como su actividad secundaria. Por dicho motivo cabe esperar que el número de colmenas por apiario que manejen sea menor, debido al tiempo que puede llevar el control de las mismas.

Con relación a las prácticas de manejo analizadas, una de las más importantes es el recambio de reinas. Dado que luego del segundo año de vida de la reina su postura disminuye, es recomendable realizar el reemplazo de la reina cada dos años [136]. En ambientes subtropicales, la recomendación es realizar dicho recambio todos los años ya que la actividad de postura es mayor en ese tipo de climas [136]. A partir del análisis de los resultados obtenidos, se puede concluir que no se encuentra extendida la práctica de recambio anual de reinas entre los apicultores de las regiones de Chaco. Lo anterior puede deberse, en primera instancia, a la falta de conocimiento sobre la implementación de esta técnica. No obstante, no puede descartarse como motivos que expliquen la baja adopción de esta práctica de manejo la poca disponibilidad en sus territorios de reinas de calidad o incluso el costo asociado a la implementación de dicha práctica que puede desalentar a los apicultores. La implementación de esta práctica es más homogénea entre los apicultores ubicados en las regiones de Santa Fe. No obstante, el recambio frecuente de reinas continúa siendo implementada por un número reducido de los apicultores encuestados. Se ha determinado que inducir el reemplazo de la reina puede constituirse en una medida a corto plazo que los apicultores pueden usar con otras tácticas para controlar *Nosema* spp. Diversas investigaciones han demostrado que al criar reinas nuevas y potencialmente más fértiles se pueden reducir las infestaciones provocadas por *N. ceranae* y *N. apis* [155, 156]. Adicionalmente, resulta efectivo aplicar esta estrategia durante los períodos de mayor floración con abundantes recursos nutricionales, lo que permitiría que la colonia se recupere. Adicionalmente, el reemplazo de la reina se vio asociado a la sanidad con relación a los niveles de infestación de *Varroa* en trabajos realizados en la región del centro del país, aquellas colmenas que realizan recambio de reinas cada dos años o menor a este período presentan menores cargas parasitarias de *Varroa* [154].

Otra de las prácticas analizadas se relaciona con la ubicación del apiario. Para los apicultores que contestaron la encuesta, cuyos apiarios se encontraban en clima templado (regiones de Santa Fe) se destacó que existe mayor número de apiarios en sol directo comparado con los de clima subtropical. No obstante, también existe un alto porcentaje de apiarios ubicados bajo árboles de hojas caducas y perennes. Lo anterior permite la circulación de aire y la obtención de luz directa entre las colmenas, reduciendo en este tipo de climas la incidencia de enfermedades que podrían proliferar en condiciones de humedad y oscuridad excesiva: Loque Europea, Cría Ensacada, Cría Yesificada y Nosemosis. Por otro lado, en ambientes subtropicales, se recomiendan los lugares con sombra, dado que evitan las altas temperaturas que puedan perjudicar la cría y el derretimiento de los panales [136]. Entre los apicultores encuestados que tenían sus colmenas en ambientes de clima subtropical (regiones del Chaco), presentaban sus colmenas en mayor medida, bajo árboles de hojas perennes, coincidente con la recomendación antes mencionada. Para el caso de los ambientes templados, la ubicación de los apiarios debería favorecer que las colmenas tengan luz de sol en abundancia en los meses de invierno, lo que propicia un menor uso de miel por parte de las colmenas y reduce la mortandad. Cabe aclarar que las abejas soportan bajas temperaturas, pero el exceso de humedad es el principal problema en estos casos, ya que las abejas eliminan más agua metabólica al consumir la miel, la cual debe ser eliminada del interior de la colmena [136].

La calidad de los panales fue otra práctica analizada, los mismos pueden estar contaminados con material infectante de distintas enfermedades, principalmente las que afectan a la cría. La práctica recomendada por el Manual Apícola para Ambientes Subtropicales [136] es recambiar anualmente el 30% de los panales de la cámara de cría. Con relación a esta técnica los productores respondieron en forma variada, siendo una práctica muy utilizada en el Centro de Santa Fe, pero no así en la región de Chaco Semi-árido. Los panales pueden acumular esporas de distintos parásitos y pesticidas dentro de las colonias por lo que su recambio reduce la acumulación de dichos factores estresantes [41, 48].

El uso del poncho tiene como función disminuir el consumo de miel al aislar el bolo invernal de los espacios vacíos, cubriendo solo los cuadros que presentan abejas [157]. La utilización del poncho, suele ser una práctica extendida entre los apiarios de regiones de

clima templado, que permite el resguardo del nido de cría en las épocas de invierno cuando la colmena se achica. En los resultados del presente trabajo se distingue que las regiones de Santa Fe suelen emplearlo con mayor frecuencia y esto se debe precisamente a las variaciones térmicas que pueden generar disminuciones en la temperatura. La región que presentó su menor uso es una región de clima subtropical con una estación húmeda sumamente marcada lo que, combinado con altas temperaturas, podría propiciar el desarrollo de diferentes parasitosis. Teniendo en cuenta esta situación ambiental es de esperar que la región de Chaco Húmedo presente un número reducido de apicultores que implementen esta técnica. Algunas parasitosis, como es el caso de la Nosemosis, pueden estar favorecidas por el uso de ponchos, ya que propician el tiempo de exposición y brindan condiciones de temperaturas óptimas para su desarrollo, haciendo que la humedad generada por la colonia no pueda disiparse y genere un microclima de alta humedad interna [157].

Conclusiones

- ✓ Las regiones presentaron diferencias climáticas y ambientales bien marcadas, las cuales repercuten en ciertas prácticas de manejo, particularmente las que están en estrecha relación con las condiciones climáticas (administración de suplementos, ubicación del apiario).
- ✓ Existen algunas prácticas que no se encuentran implementadas en gran medida en las regiones agro-ecológicas del Chaco y sí lo están en las regiones de Santa Fe. Lo anterior puede deberse a un mayor desarrollo de la actividad apícola con mayor tecnificación en las regiones de Santa Fe, a diferencia de lo que se observa en las regiones de Chaco donde la actividad comenzó a desarrollarse hace menos tiempo.
- ✓ Sería propicio fomentar el desarrollo de la actividad en ambientes subtropicales dado su potencial productivo, de manera de llegar con la tecnificación que se emplea en otras regiones y que puede servir en última instancia para mejorar la producción de las colmenas.
- ✓ Implementar de manera acertada las técnicas utilizadas en los ambientes donde existen mayores limitaciones nutricionales para las abejas, podría mejorar los rendimientos y la actividad apícola podría pensarse como actividad primaria, ya que una de los principales

retos a los que se enfrenta la actividad es el hecho de no ser considerada una actividad principal.

**Capítulo II: Variación anual de la infección con
Nosema spp. en colmena emplazadas en
diferentes regiones agro-ecológicas**

Introducción

Se han reportado en los últimos años, grandes pérdidas de colmenas en distintas partes del mundo [158, 159, 160]. Las posibles causas y los factores asociados a estas pérdidas se relacionan con problemas sanitarios, nutricionales o causadas por el aumento del uso de plaguicidas [61, 160, 162, 163, 164]. Mucho se ha debatido con relación a dichos factores, siendo aceptada la idea de que las pérdidas de colmenas se producen por múltiples factores [159, 164]. En algunos casos, poder realizar un diagnóstico de los factores asociados con las pérdidas de colmenas suele ser una tarea compleja.

Los problemas sanitarios que repercuten sobre las colonias suelen ser difíciles de diagnosticar y pueden presentar efectos subletales a largo plazo [165]. Por tal motivo, suele ser arduo para los apicultores determinar cuándo y por qué las colonias están experimentando problemas sanitarios. Por otro lado, los umbrales a partir de los cuales las enfermedades dañan seriamente a las colonias son usualmente desconocidas. Las estrategias de manejo para mitigar efectivamente estos problemas sanitarios tampoco están bien desarrolladas y, en algunos casos, el enfoque de manejo puede crear un estrés involuntario para la colonia [165].

Uno de los factores que presenta las dificultades antes mencionadas para su control y determinación de los efectos subletales es la Nosemosis, una enfermedad causada por dos especies de microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. Dichos patógenos se encuentran distribuidos alrededor del mundo [5, 166, 167]. En las abejas, la infección por *Nosema* se transmite principalmente a través de la exposición fecal-oral cuando limpian o consumen alimentos o agua contaminada con esporas de *Nosema* [4].

La dinámica temporal de las infecciones por ambas especies del patógeno presenta ciertas variaciones. Para el caso de *N. apis* en climas templados, se ha descrito un patrón característico, exhibiendo una baja prevalencia durante el verano, un pequeño pico en el otoño y un lento incremento de la infección durante el invierno. En la primavera, las infecciones aumentan rápidamente a medida que comienza la producción de celdas de cría, mientras que las posibilidades de vuelo aún son limitadas [27, 43]. Poco se conoce sobre la dinámica temporal de las infecciones por *N. apis* en climas tropicales o subtropicales. La infección parece estar presente, pero con un bajo impacto en la aptitud productiva de la colonia [168] y probablemente sin la dinámica temporal pronunciada observada en climas templados [46].

Por otro lado, en España, se consideró, con base a un trabajo de análisis de la prevalencia de *N. ceranae*, que esta especie no presenta grandes fluctuaciones a lo largo del año [99]. No obstante, estudios realizados en otros países han informado que los niveles de *N. ceranae* en las colonias fluctúan o presentan ciclos [63, 64, 93, 169], considerando que los niveles de parásito son estacionales o se relacionan con la temperatura ambiental [170]. Esta conclusión se obtuvo de un trabajo realizado en 11 países europeos que mostró una mayor prevalencia de *Nosema* spp. esporas en colonias ubicadas en el norte de Europa (Finlandia, Dinamarca, Polonia, Austria, Alemania del norte) en comparación con las colmenares ubicadas en el sur de Europa (Croacia, Italia, Bulgaria, Grecia, Macedonia del sur) [66]. De acuerdo con las explicaciones hipotéticas de las fluctuaciones estacionales de *Nosema*, los autores propusieron que los climas más fríos limitan la capacidad de las abejas para defecar fuera de la colonia, lo que lleva a mayores niveles de infección, especialmente en la primavera y el otoño [66].

El recuento medio de esporas por abeja se ha utilizado tradicionalmente para determinar la incidencia de la infección en una colonia [171, 172, 173]. Se ha establecido una relación estrecha entre el recuento de esporas y el grado de infección para esta enfermedad siendo este parámetro utilizado para evaluar la necesidad de tratamiento [173]. Sin embargo, la relación entre el recuento de esporos y la salud de la colonia puede no ser tan precisa [174,175]. El recuento de esporos no está directamente relacionado con la carga parasitaria y el estado de salud de colonias infectadas naturalmente por *N. ceranae* en condiciones de campo [61]. Según estos resultados, el recuento de esporos no sería útil para medir el estado de salud de una colonia [85].

Alternativamente, algunos estudios sugieren que determinar el porcentaje de abejas infectadas dentro de una muestra es un mejor indicador de la intensidad de la infección [61, 83, 174, 176]. Este último método requiere mucho tiempo y es poco práctico a nivel de campo [87]. Sin embargo, en algunos casos se ha visto que existe una buena correlación entre la proporción de abejas infectadas y el número promedio de esporos en una muestra combinada de abejas [81], pero continúa siendo un aspecto de mucho debate en la comunidad científica [63].

Objetivos

1. Analizar la variabilidad mensual de la carga y prevalencia de esporos de *Nosema* spp./abeja a lo largo de un año de estudio en diferentes eco-regiones del país.

2. Determinar la relación entre la prevalencia y la carga de esporos de *Nosema* spp./abeja.

Materiales y métodos

En 19 apiarios ubicados en las diferentes regiones agroecológicas de Santa Fe Sur, Centro, Chaco Húmedo, de Transición y Semiárido, definidas en las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa, se realizaron muestreos para determinar la presencia de *Nosema* spp., desde septiembre/octubre de 2014 hasta septiembre/octubre de 2015.

En cada apiario se seleccionaron aleatoriamente un número de colmenas (10% de las colmenas existentes en el apiario o un mínimo de seis si el mismo tenía menos de 60 colmenas), las cuales fueron monitoreadas mensualmente durante un año.

De cada apiario se registraron los siguientes datos: temperatura y humedad ambiental (tomados de las estaciones meteorológicas más cercanas al sitio donde radica el apiario); recuento y prevalencia de esporos de *Nosema* y parámetros que caracterizan la fortaleza de las colmenas (población de abejas, área con cría, con polen y con miel) según las siguientes especificaciones:

- ✓ Población de abejas por colmena: se contabilizó el número de cuadros cubiertos por abejas de acuerdo con la metodología reportada por Murilhas [179].
- ✓ Área de cría: Se realizó una división visual de las celdas de cría de obreras en 10 sub-áreas y se empleó una escala de 0 a 1 para estimar la superficie del panal cubierta con cría, luego se realizó la transformación de los datos de acuerdo a la metodología reportada por Murilhas [179].
- ✓ Recuento de esporos de *Nosema* spp.: Se empleó el protocolo de monitoreo y remisión de ejemplares reportado por Sarlo [7]. De cada colmena se tomaron 100 abejas retornantes del vuelo directamente de la piquera empleando frascos plásticos conteniendo 60 ml de alcohol 70%. La suspensión de esporos se preparó macerando 60 abdómenes de abejas seleccionadas aleatoriamente. El número de recuentos de esporos de *Nosema* spp./abeja fue determinado mediante microscopio óptico y hemocitómetro. De cada muestra se contó el número de esporos contenido en 80 cuadros del hemocitómetro (5 grupos de 16 cuadros) siguiendo la metodología reportada por Cantwell [110] y modificada por Del Hoyo [180]. Esta metodología de muestreo es la empleada tradicionalmente para estimar la intensidad de la infección y

permite detectar hasta un mínimo de 5% de abejas infectadas con un 95% de confianza [48].

- ✓ Prevalencia de *Nosema* spp.: Se empleó la metodología reportada por Sarlo [4], estimándose la prevalencia de cada muestra a partir de una sub-muestra de 20 abejas. A cada abeja se le extrajo el abdomen, se los maceró en forma individual en 1 ml de agua destilada y un volumen de 50 μ l del homogeneizado se observó bajo microscopio óptico. Los valores se registraron como presencia o ausencia de esporos en 20 campos observados.

Análisis estadístico

Se realizó una descripción de las variaciones en la cantidad de esporos de *Nosema* spp./abeja encontradas en cada una de la regiones, relacionando ambas técnicas de análisis, tanto recuento como prevalencia. Se analizaron las variaciones a lo largo del año del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja y población de abejas, la cantidad de cría, temperatura y humedad relativa en las distintas regiones analizadas. Se realizó un ANOVA Factorial (sin interacciones) tanto de la prevalencia como del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja y su relación con la región y las fechas de muestreo.

Resultados

Variación mensual de la prevalencia y recuento de esporos de Nosema spp./abeja por región y relación con los parámetros de la colmena.

Región 1: Santa Fe Sur.

Al evaluar el desarrollo de la parasitosis en función de la población de abejas se observó cierta estabilidad a lo largo del año en la cantidad de abejas adultas en la colmena, llegando a un máximo de abejas en el mes de febrero y descendiendo lentamente en los siguientes meses del año. La carga esporular de *Nosema* spp. en el momento que las colmenas comienzan a reducir su número de abejas aumentó. Para el caso de las celdas de cría por colmena, presentó sus valores máximos en el mes de enero, posterior a dicho mes se observó una reducción abrupta en el número de celdas con cría por colmena, hasta estabilizarse en niveles bajos en el mes de abril y manteniéndose en valores relativamente constantes durante los meses siguientes. Con relación a dicha variable y la carga de

esporos de *Nosema* spp., éstas aumentan de manera considerable en los meses en los cuales se redujo el número de celdas de cría (Figura 1).

Cabe aclarar que los valores de la media de celdas de cría son sumamente elevados en el mes de enero, reportando colmenas completamente cubiertas de cría.

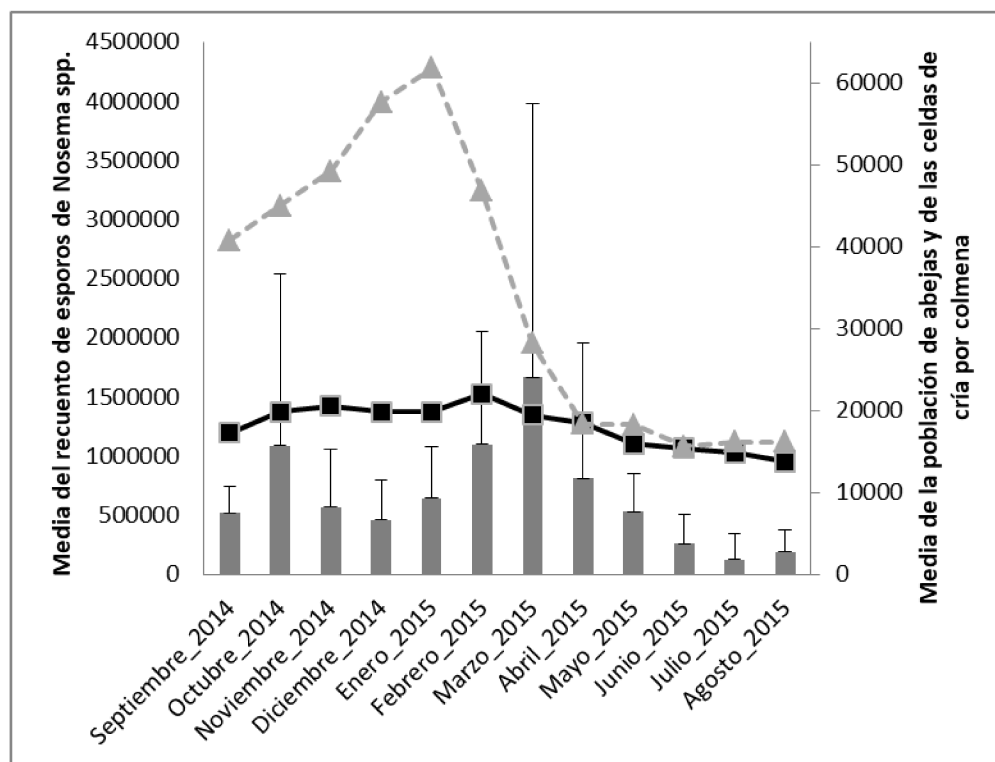


Figura 1. Media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja (barras) y media del número de abejas por colmena (línea negra) y celdas de cría (línea punteada gris) a lo largo del año de estudio en la Región Santa Fe Sur.

La media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja para el Sur de Santa Fe a lo largo de un año fue de 649.819 ± 925.706 (Tabla 1), siendo los valores más elevados en octubre 2014 y marzo 2015. La media de la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. a lo largo de un año fue de $0,37 \pm 0,28$, Santa Fe Sur presentó la mayor prevalencia observada entre las regiones analizadas ($P < 0,001$) y presentó diferencias significativas con todas las regiones de Chaco, ($P < 0,001$). Los resultados por mes indican que en febrero se presentó la mayor prevalencia en dicha región. Se distingue en la Figura 2 cierta sincronía entre los

valores del recuento y prevalencia de esporos de *Nosema* spp. patrón con algunas discrepancias entre los meses de febrero y marzo.

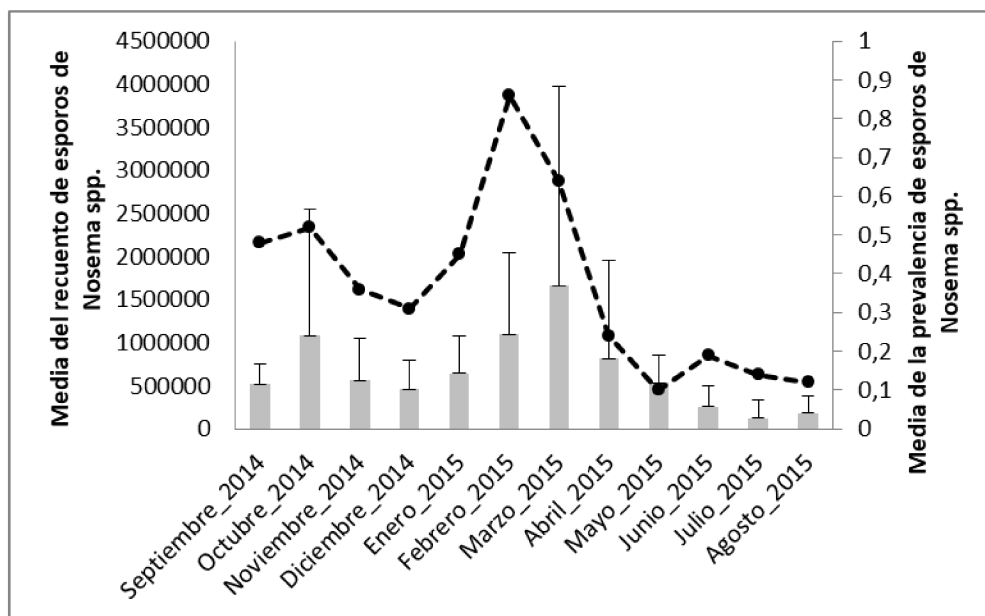


Figura 2. Media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja (barras) y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. (línea) a lo largo de un año en la región Santa Fe Sur.

Región 2: Centro de Santa Fe

Existe un desarrollo importante en la cantidad de abejas dentro de la colmena en los meses de primavera y verano, hasta el mes de marzo, donde comienza a vislumbrarse una disminución leve en la población. Al observar los niveles de esporos de *Nosema* spp./abeja con relación al número de celdas de cría, se pueden apreciar aumentos en los niveles esporulares posteriores o en el mismo momento que se evidencia una fuerte disminución del número de celdas de cría, particularmente en los meses de enero y mayo (Figura 3).

La región Centro de Santa Fe, presentó diferencias significativas en el recuento de esporos de *Nosema* spp. con las regiones de Chaco Húmedo ($P < 0,001$) y con la región de Chaco de Transición ($P = 0,002$).

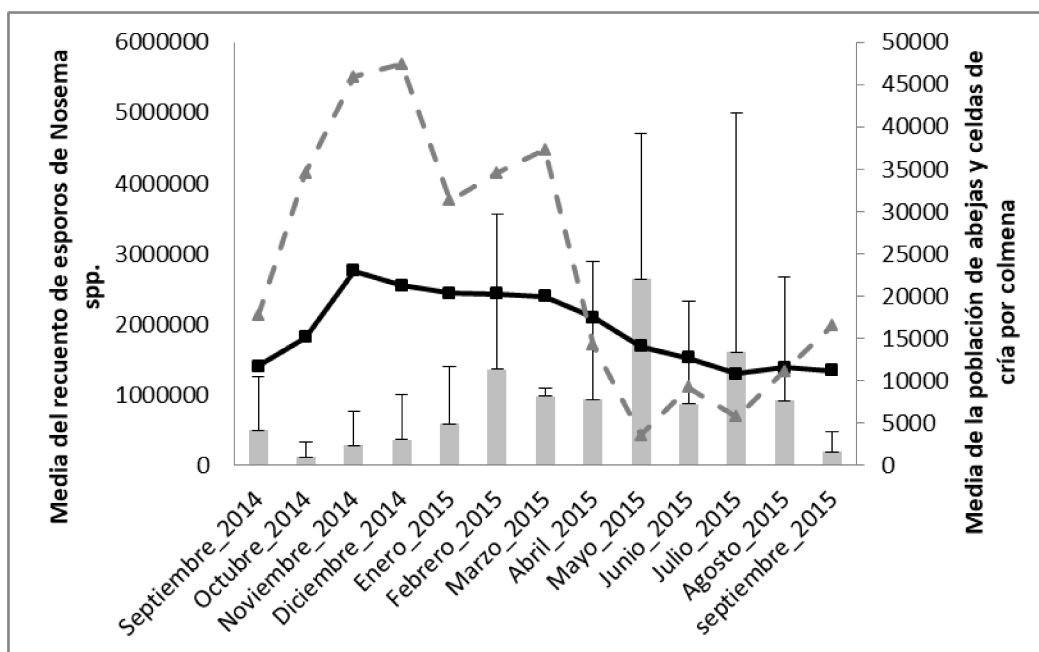


Figura 3. Media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja (barras) y media del número de abejas por colmena (línea negra) y celdas de cría (línea punteada gris) a lo largo del año de estudio en la Región Centro de Santa Fe.

La media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja para el Centro de Santa Fe a lo largo de un año fue de $761.300 \pm 1.680.610$ (Tabla 1), siendo los valores más elevados en comparación al resto de las regiones analizadas. Los niveles más elevados se encontraron en los meses de febrero y mayo de 2015. Para el caso de la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. se pudo determinar en marzo el mayor valor dentro de la serie estacional (Figura 4). En esta región se puede observar en algunos meses cierta relación entre los niveles de recuento y prevalencia de esporos de *Nosema* spp., aunque el patrón no es tan marcado como en el caso de Santa Fe Sur. Las prevalencias de esporos de *Nosema* spp. para esta región presentaron diferencias significativas con relación al resto de las regiones de Chaco ($P < 0,001$), siendo la prevalencia más alta luego del Sur de Santa Fe, con la cual no presento diferencias ($P = 0,083$).

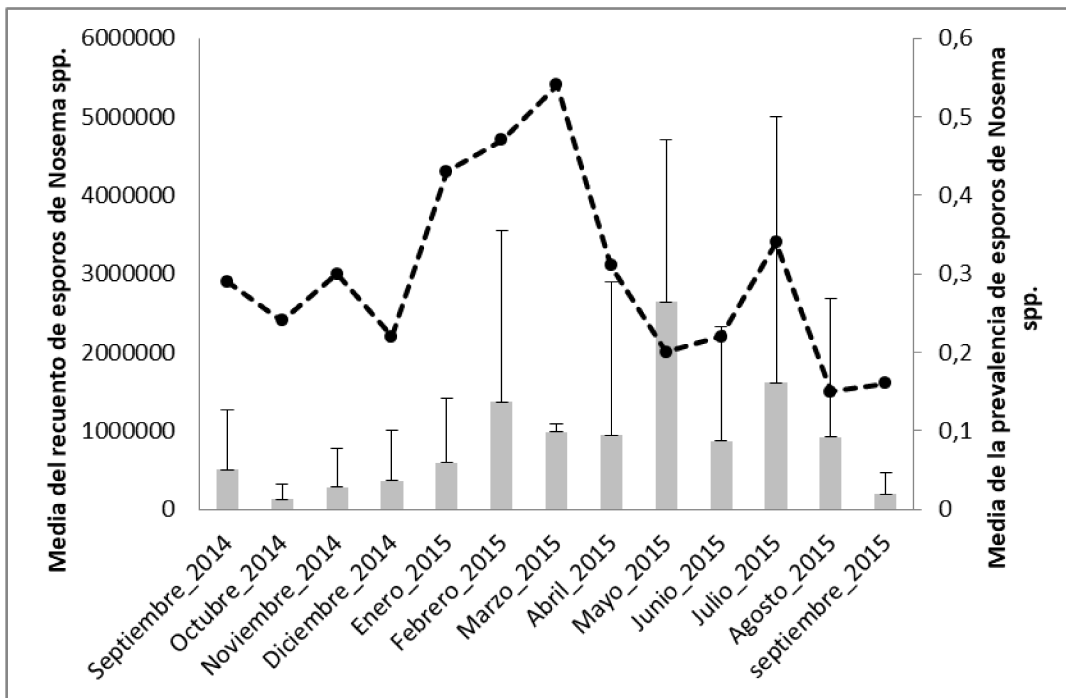


Figura 4. Media del recuento (barras) y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. (línea) a lo largo de un año en la región Centro de Santa Fe.

Región 3: Chaco Húmedo

A diferencia de lo observado en las regiones de Santa Fe, se aprecia en la región Chaco Húmedo menores niveles esporulares de *Nosema* spp., siendo la media del recuento de esporos para esta región la más baja a lo largo de un año con 118.067 ± 320.860 esporos/abeja, con diferencias significativas para el resto de las regiones ($P=0,044$), con excepción del Chaco de Transición. Se observa que, en los meses de primavera y verano, cuando las colmenas estaban en pleno desarrollo, los niveles de *Nosema* spp. se vieron reducidos para luego aumentar las cargas en los meses donde disminuyó, en particular, el número de celdas de cría (Figura 5).

Además de presentar diferencias significativas con la región del Centro de Santa Fe ($P<0,001$), también el recuento de esporos de *Nosema* spp. fue inferior al de la región de Chaco Semi-árido ($P<0,001$).

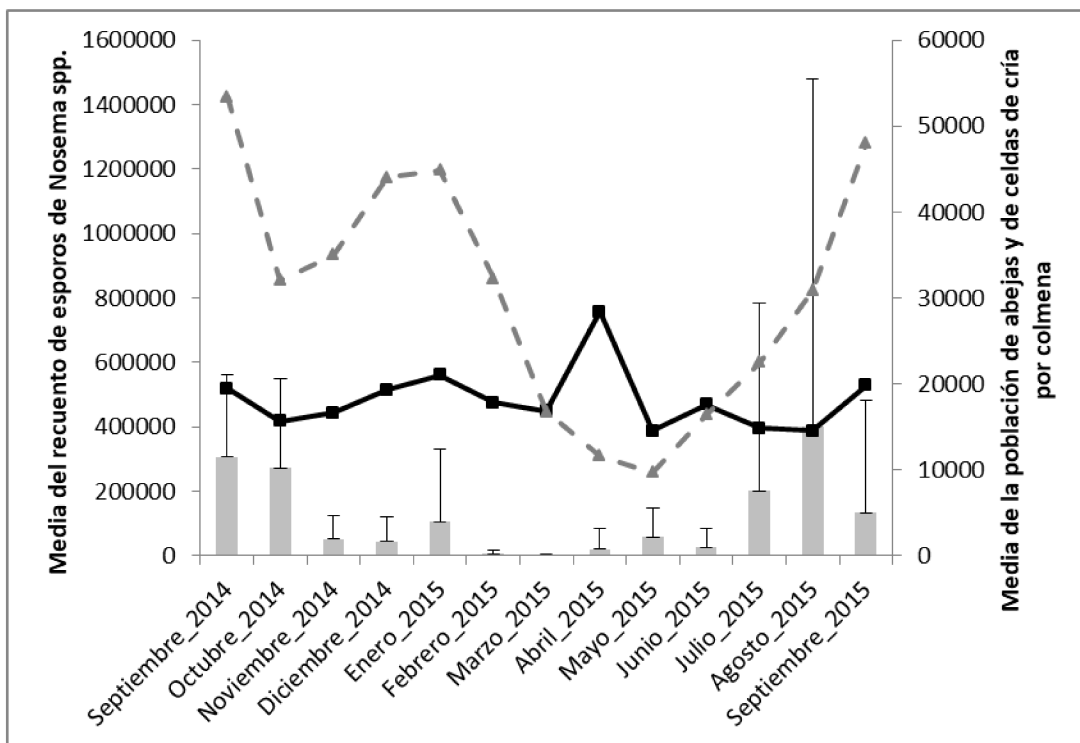


Figura 5. Media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja (barras) y media del número de abejas por colmena (línea negra) y celdas de cría (línea punteada gris) a lo largo del año de estudio en la Región Chaco Húmedo.

Los meses con mayor prevalencia fueron octubre de 2014 y septiembre de 2015. La región de Chaco Húmedo presentó la menor prevalencia de esporos de *Nosema* spp. con $0,15 \pm 0,18$. Pueden determinarse ciertas coincidencias entre patrones de los niveles de recuento y prevalencia de esporos de *Nosema* spp. a lo largo del año (Figura 6). En particular se observa que ambos diagnósticos indican niveles bajos de infección a lo largo del año.

Esta región presentó diferencias significativas en la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. con las dos regiones de Santa Fe ($P < 0,001$).

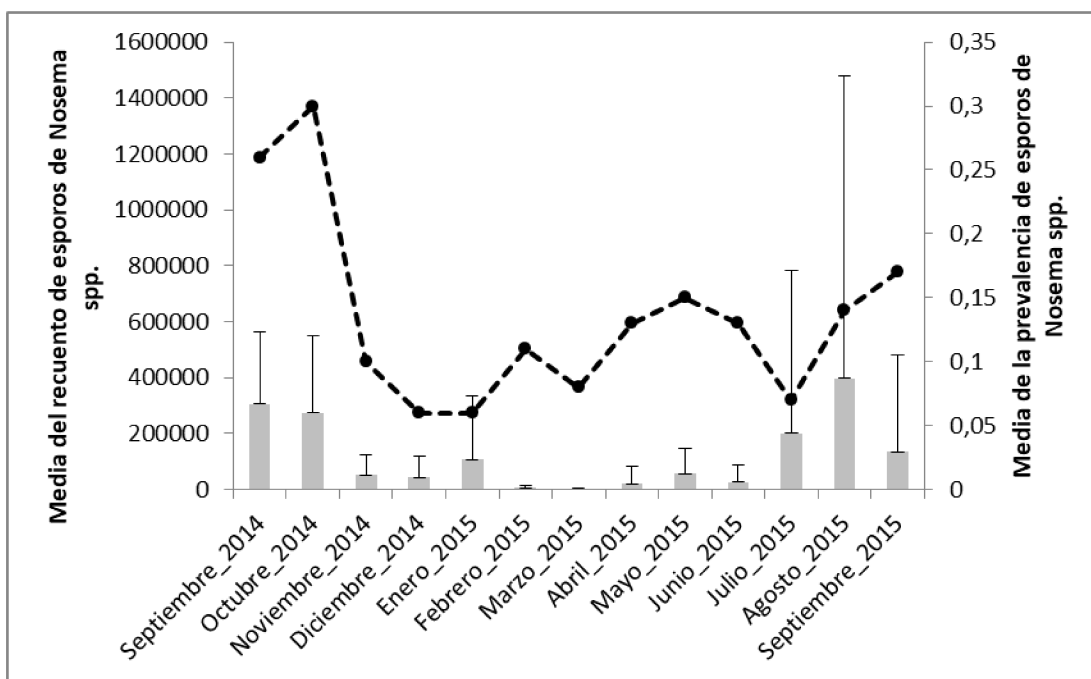


Figura 6. Media del recuento (barras) y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. (línea) a lo largo de un año en la región Chaco Húmedo.

Región 4: Chaco de Transición

Del mismo modo que en el Chaco Húmedo, la región de Chaco de Transición presentó niveles bajos de cargas esporulares de *Nosema* spp. a lo largo del año, diferenciándose claramente de lo que ocurrió en las regiones de Santa Fe y Chaco Semi-árido. La población de abejas se mantuvo en niveles constantes hasta el mes de marzo donde, luego de una pequeña disminución, aumentó durante algunos meses para volver a reducirse. El número de celdas de cría fluctuó bruscamente en la primera mitad del año para luego sufrir una reducción muy marcada en el mes de junio. Con relación al desarrollo de la colmena en función de las cargas de *Nosema* spp. se observó un nivel máximo de recuento de esporos (septiembre 2014) en momentos donde la colmena se encontraba en pleno desarrollo, a diferencia de lo observado en el resto de las regiones donde las cargas máximas se registraron cuando se observaba una reducción en el desarrollo de la colmena. Sin embargo, a diferencia del resto de las regiones las cargas máximas aquí mencionadas están muy por debajo de los niveles altos presentados por ejemplo en las

regiones de Santa Fe. En el resto del año los niveles de *Nosema* spp. fueron muy bajos (Figura 7).

El recuento de esporos de *Nosema* spp. fue inferior a lo registrado para la región del Centro de Santa Fe ($P=0,002$) y el Chaco Semi-árido ($P=0,006$).

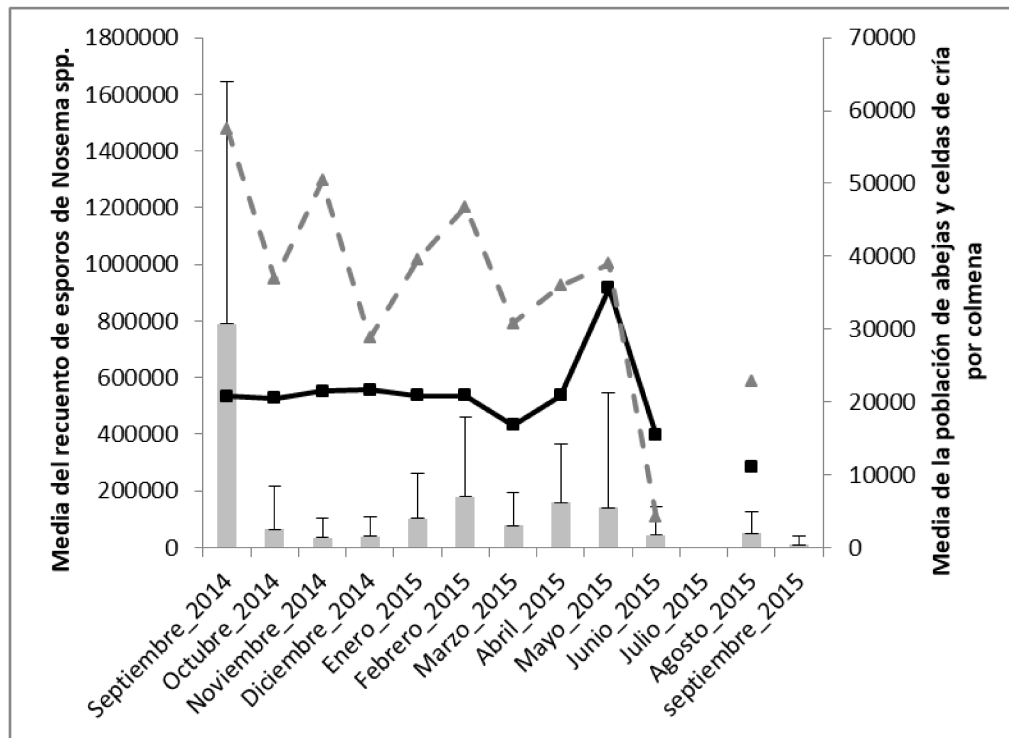


Figura 7. Media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja (barras) y media del número de abejas por colmena (línea negra) y celdas de cría (línea punteada gris) a lo largo del año de estudio en la Región Chaco de Transición.

La prevalencia de esporos de *Nosema* spp. fue de $0,18 \pm 0,19$ a lo largo del año de estudio, presentando prevalencias menores en relación a las regiones de Santa Fe ($P<0,001$). Las prevalencias más altas se observaron en septiembre de 2014 y febrero de 2015. El recuento y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. presentaron un patrón similar a lo largo del año de estudio (Figura 8) y a su vez los niveles reflejaron bajas infecciones en las colmenas en consonancia con lo que ocurrió en el Chaco Húmedo.

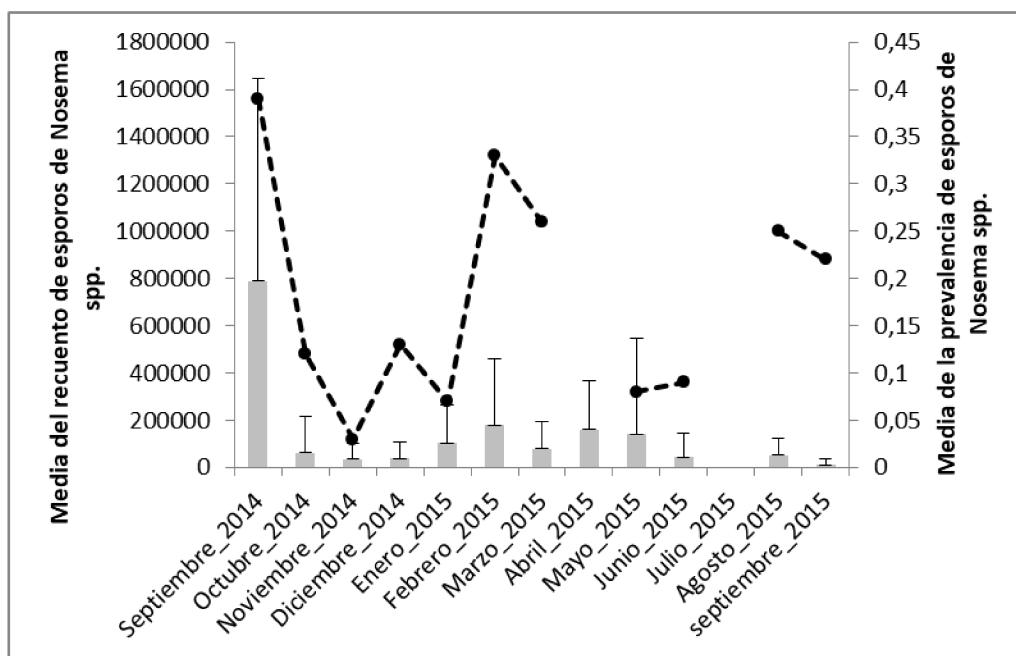


Figura 8. Media del recuento (barras) y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. (línea) a lo largo de un año en la región Chaco de Transición.

Cabe aclarar que debido a las lluvias intensas en el área de estudio no se obtuvieron resultados en el mes de julio de 2015, la muestra de prevalencia de abril tampoco pudo ser analizada dada la presencia de un número insuficiente de abejas en la muestra.

Región 5: Chaco Semi-árido

La media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja para el Chaco Semi-árido fue similar a lo registrado para las regiones de Santa Fe. Sin embargo, el comportamiento de la enfermedad a lo largo del año no fue similar a lo reportado para las regiones de Santa Fe. Por un lado, los niveles del recuento de *Nosema* spp. se incrementaron en el mes de julio de 2015, siendo los valores previos sumamente bajos. Por otro lado, se distingue con relación al desarrollo de las colmenas, un elevado número de abejas y de cría durante casi todo el año, exceptuando el mes previo al pico de esporos de *Nosema* spp. que presentó niveles bajos de celdas de cría y en los meses posteriores una disminución en la población de abejas (Figura 9). El recuento de esporos de *Nosema* spp. presentó diferencias

significativas con las regiones de Chaco ($P < 0,001$ con Chaco Húmedo y $P = 0,006$ con Chaco de Transición).

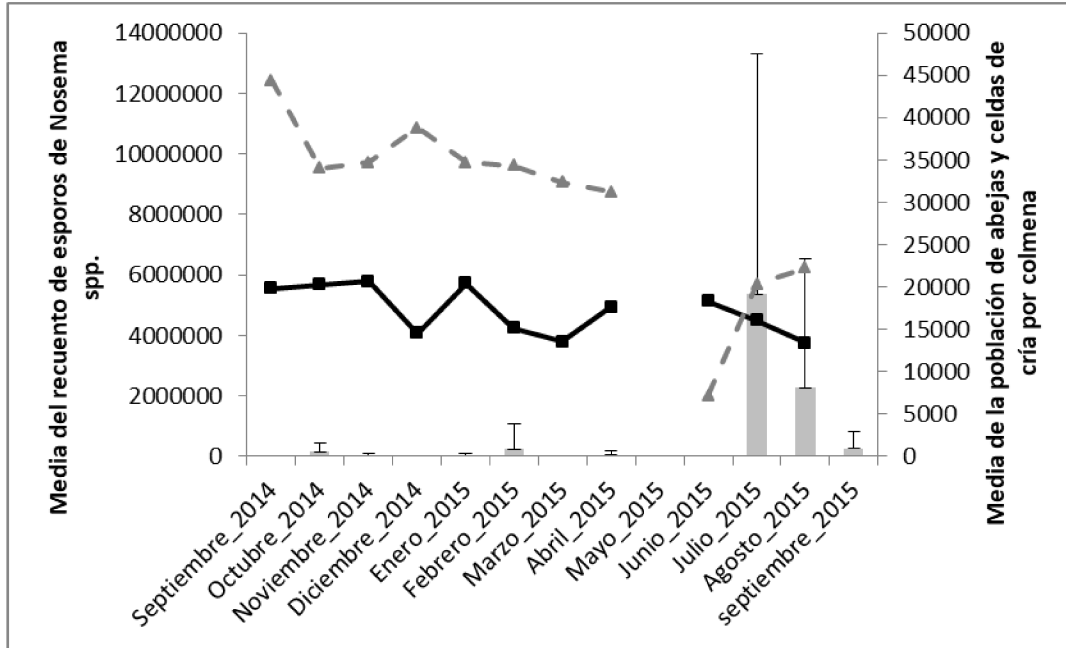


Figura 9. Media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja (barras) y media del número de abejas por colmena (línea negra) y celdas de cría (línea punteada gris) a lo largo del año de estudio en la Región Chaco Semi-árido.

Las menores prevalencias de abejas infectadas con *Nosema* spp. se dieron en septiembre de 2014 y marzo de 2015. El recuento y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. presentaron un patrón similar a lo largo del año de estudio (Figura 10) y en consonancia con lo observado en otras regiones, con valores bajos de ambas técnicas diagnósticas al comienzo del año y un aumento que se registró a la par en el mes de julio. La prevalencia de esporos de *Nosema* spp. para el Chaco Semi-árido presentó diferencias significativas con las regiones de Santa Fe ($P < 0,001$).

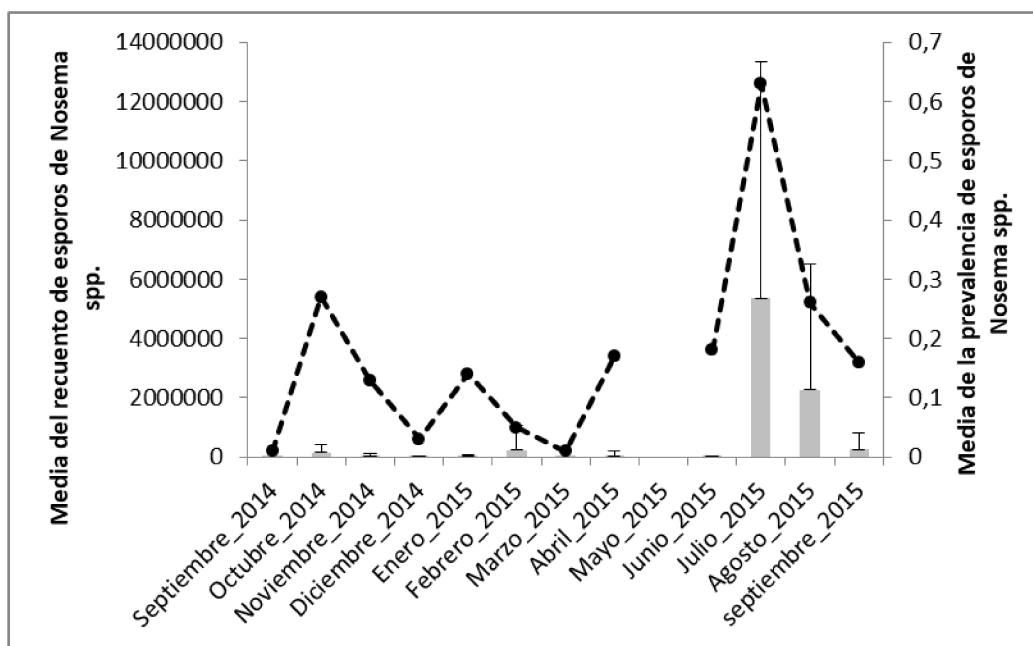


Figura 10. Media del recuento (barras) y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. (línea) a lo largo de un año en la región Chaco de Transición.

Cabe aclarar que debido a las lluvias intensas en el área de estudio no se obtuvieron resultados del mes de mayo de 2015.

Tabla 1: Información de los valores medios de recuento y prevalencia de esporos de *Nosema* spp. diferenciados por región agroecológica.

	Media del recuento	Desvío del recuento	Rango del recuento	Media de la prevalencia	Desvío de la prevalencia	Rango de la prevalencia
Santa Fe Sur	649.818	925.706	(1.000; 5.251.000)	0,37	0,28	(0; 1)
Centro de Santa Fe	761.300	1.680.610	(1.000; 1.472.600)	0,28	0,27	(0; 1)
Chaco húmedo	118.067	340.859	(1.000; 4.066.000)	0,15	0,18	(0; 1)
Chaco de Transición	1.677.425	411.888	(1.000; 2.861.000)	0,17	0,19	(0; 0,9)
Chaco Semi-árido	718.948	2.964.995	(1.000; 23.201.000)	0,17	0,26	(0; 1)

Variación general mensual de la prevalencia y recuento de esporos de Nosema spp./abeja y su relación con los parámetros de la colmena.

Las medias generales del recuento de esporos de *Nosema* spp. con relación a los parámetros de fortaleza de la colmena (población de abejas y celdas de cría) presentaron un patrón característico. El mayor nivel esporular de *Nosema* spp. se observó, independientemente de la región agroecológica analizada, en julio 2015 con más de $1.934.043 \pm 4802132$ de esporos. Con relación a este pico podemos afirmar que se produjo posterior a una reducción marcada del número de celdas de cría y de la población de abejas adultas (Figura 11).

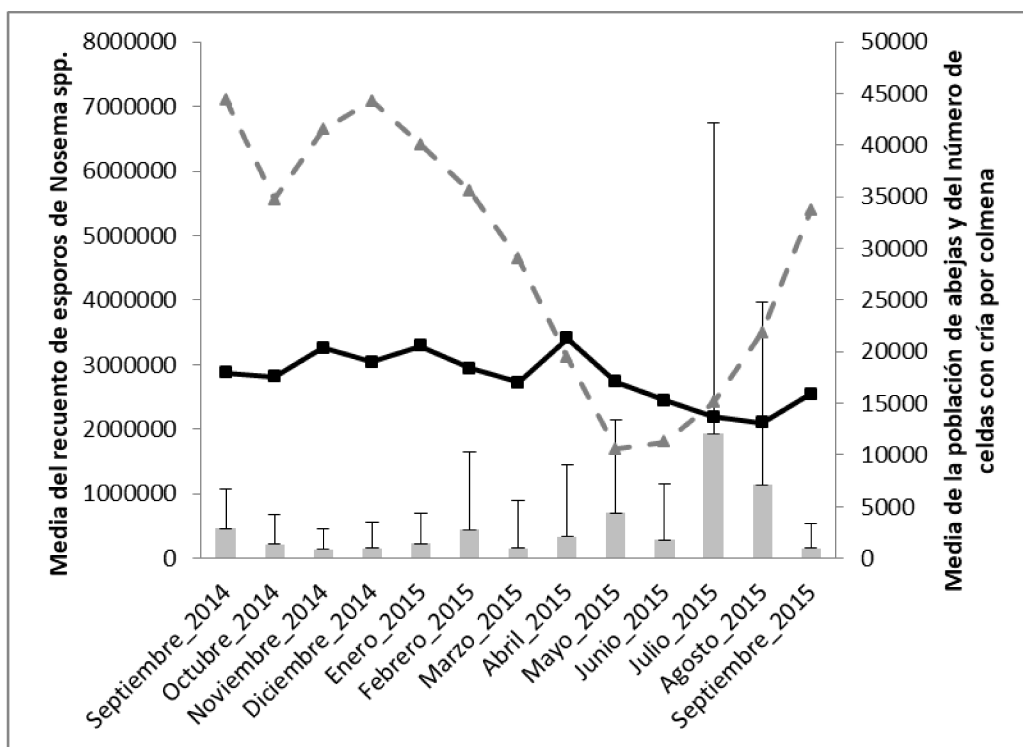


Figura 11. Media del recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja (barras) y media del número de abejas por colmena (línea negra) y celdas de cría (línea gris punteada) a lo largo del año.

Asociado con el recuento de esporos se encuentra la prevalencia de abejas infectadas que también experimentó uno de los valores más altos en el mes de julio de 2015 con valores aproximados a $0,28 \pm 0,33$. Sin embargo, el valor más elevado de prevalencia se observó en septiembre de 2014. Se distingue entre ambas técnicas de análisis de la muestra cierta relación con aumentos y disminuciones de manera sincronizada (Figura 12).

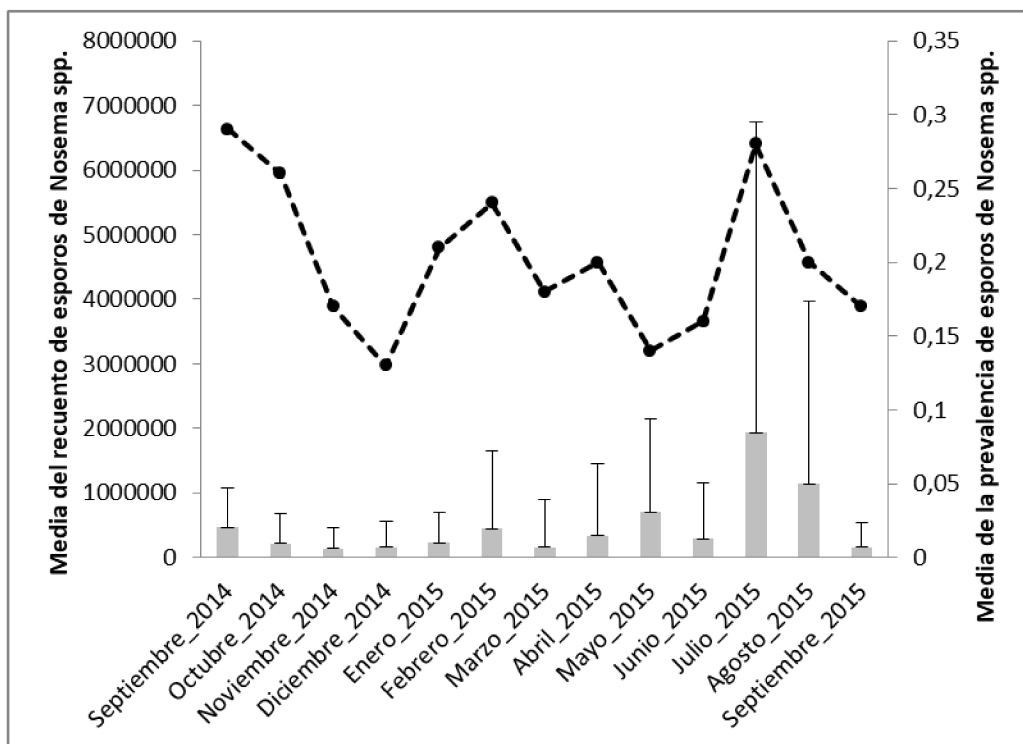


Figura 12. Media del recuento (barras) y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. (línea) a lo largo de un año.

Variaciones marginales del recuento y la prevalencia de esporos de Nosema spp.

Al eliminar el efecto de los apiarios individuales por región, se obtuvieron las medias marginales que permiten despejar la variación entre los apiarios. Los resultados demuestran un patrón coincidente entre las regiones que solo varía en función de los niveles de *Nosema* spp. tanto para el recuento de esporos como para la prevalencia (Figura 13 y 14).

Con relación a las cargas de esporos de *Nosema* spp./abeja las regiones de Santa Fe junto con el Chaco Semi-árido presentaron los niveles más altos de esporos, seguidas por el Chaco de Transición y por último el Chaco Húmedo (Figura 13). Los meses donde se

observaron mayores cargas esporulares de *Nosema spp./abeja* fueron febrero, mayo y julio de 2015.

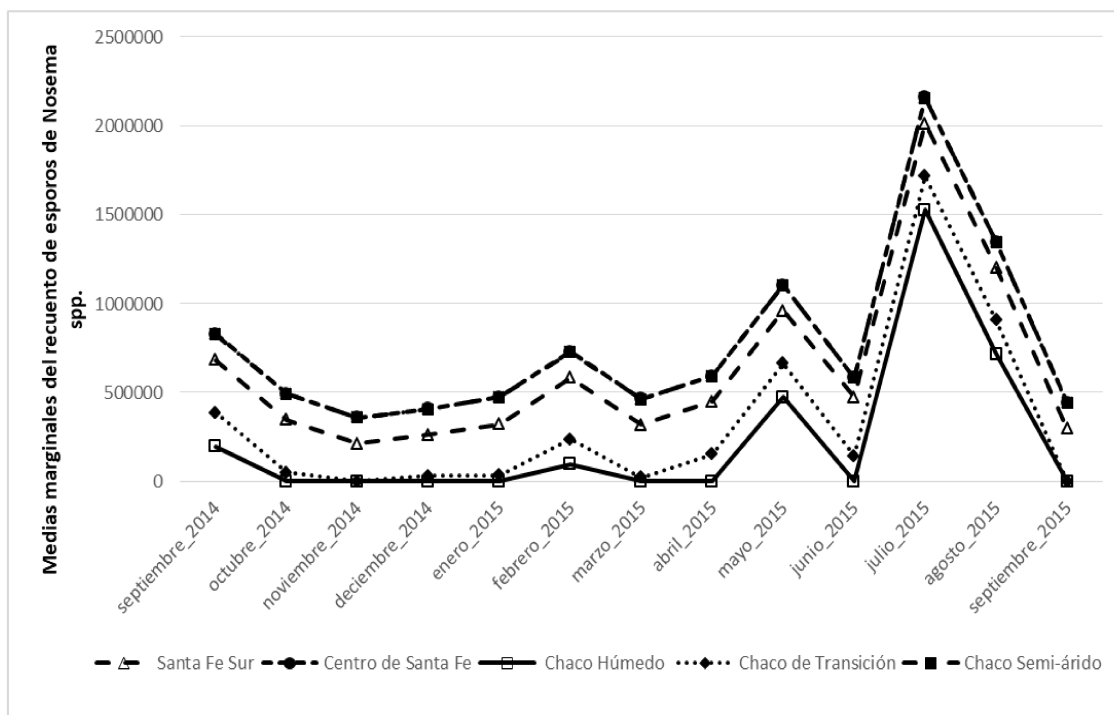


Figura 13. Patrón regional de las cargas de esporos de *Nosema spp./abeja* a lo largo de un año en las diferentes regiones analizadas.

En cuanto a la prevalencia de esporos, las regiones de Santa Fe presentaron los mayores registros a lo largo del año, distinguiéndose una diferencia importante entre ambas macro-regiones (Santa Fe y Chaco), seguidas por las regiones de Chaco en el mismo orden que lo mencionado anteriormente para las cargas de esporos (Figura 14). Los picos de prevalencia de esporos de *Nosema spp.* se dieron en septiembre de 2014 con el mayor nivel, seguido por julio de 2015 y por último en febrero de 2015.

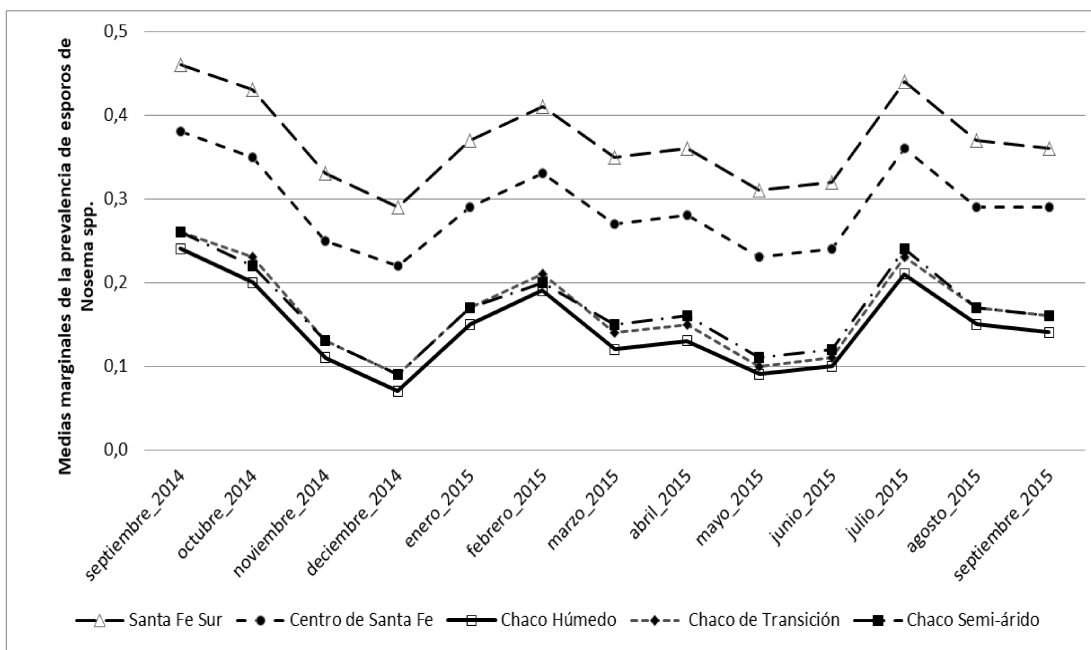


Figura 14. Medias marginales de las prevalencias de esporos de *Nosema* spp./abeja a lo largo de un año en las diferentes regiones analizadas.

Las cinco regiones presentaron una dinámica similar en relación a la población de abejas con fluctuaciones entre las 10.000 y 21.000 abejas por colmenas a lo largo del año. Solo la región de Chaco Húmedo registró un nivel más elevado en el mes de abril 2015 llegando a 28.427 abejas por colmena (Figura 15).

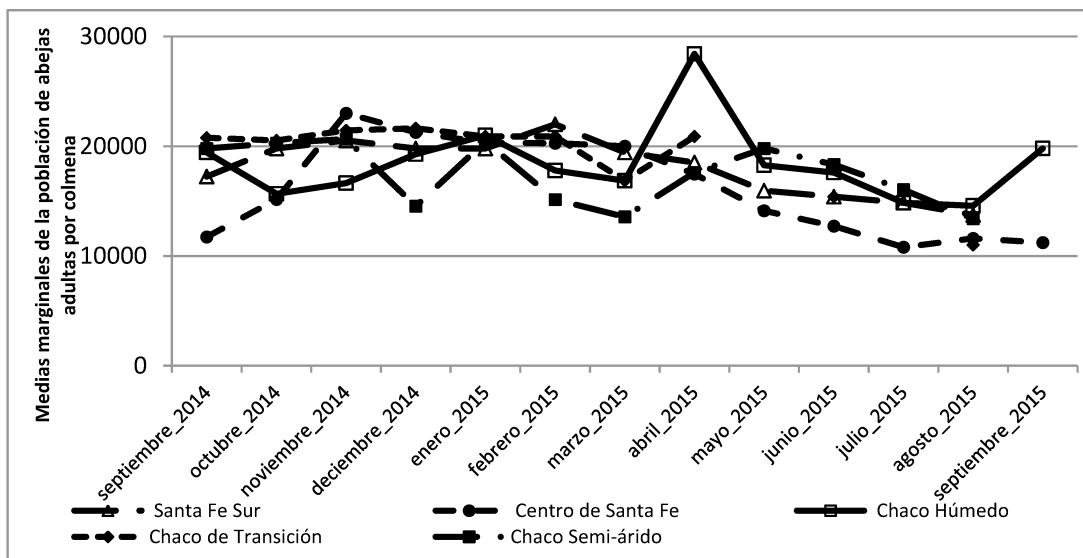


Figura 15. Medias marginales de la población de abejas adultas por colmena a lo largo de un año en las diferentes regiones analizadas.

Al analizar de manera general el número de celdas con cría en las diferentes regiones, se observa un punto de inflexión en el mes de enero, donde la cría comenzó a disminuir llegando a los niveles más bajos en los meses de mayo y junio (Figura 16).

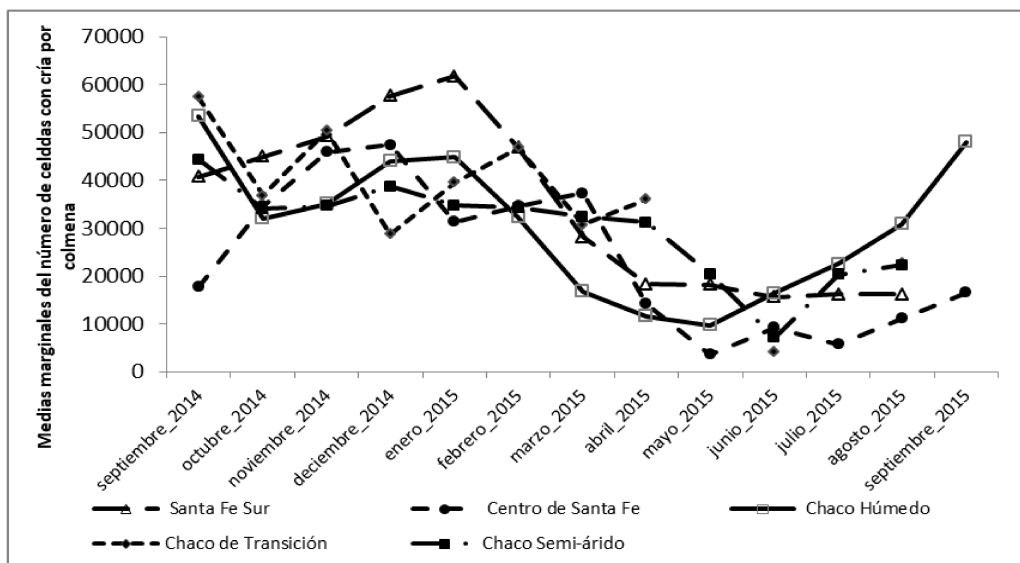


Figura 16. Medias marginales del número de celdas con cría por colmena a lo largo de un año en las diferentes regiones analizadas.

El registro de temperatura en las distintas regiones reveló un pico máximo en el mes de enero, que luego comenzó a disminuir alcanzando su menor valor en los meses de junio y julio (Figura 17). Con relación a la diferencia entre regiones, se registró el promedio máximo de temperatura en el Chaco Semi-árido ($29,8^{\circ}\text{C} \pm 4,70^{\circ}\text{C}$), obteniendo diferencias significativas con todas las regiones ($P < 0,001$), excepto con Chaco de Transición. La temperatura media anual más baja correspondió a la región de Santa Fe Sur ($22,92^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) la que fue significativamente inferior a la registrada para el resto de las regiones evaluadas ($P < 0,001$).

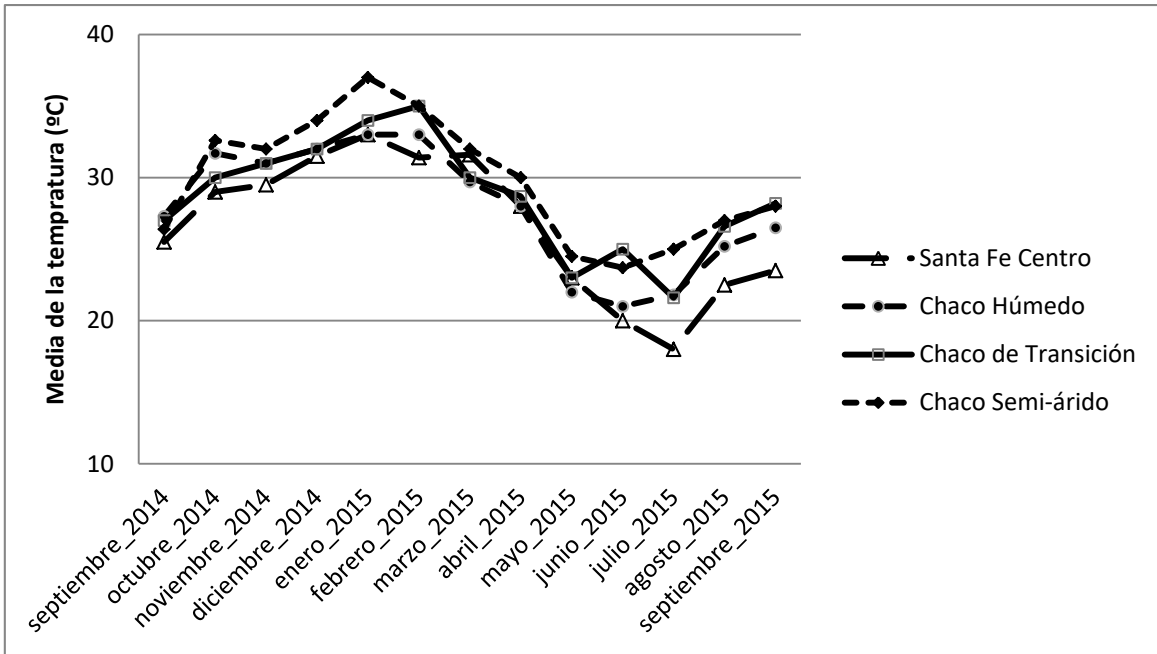


Figura 17. Medias de la temperatura a lo largo de un año en las distintas regiones analizadas.

La humedad relativa en las distintas regiones analizadas indicó un aumento progresivo, desde enero, registrándose en la mayor parte de las regiones los niveles más altos en los meses de mayo y julio (Figura 17). Al analizar por separado las regiones se distingue la media anual de humedad relativa más elevada en la región Santa Fe Sur ($75,6\% \pm 7,17\%$), con diferencias significativas con relación a las humedades registradas en Santa Fe Centro ($P < 0,001$) y Chaco Semi-árido ($P = 0,019$). Por otro lado, el registro de humedad relativa anual más bajo lo presentó la región Santa Fe Centro ($70,90\% \pm 7,55\%$), presentando diferencias significativas con el resto de las regiones analizadas ($P < 0,001$ con Santa Fe Sur, Chaco Húmedo y Chaco de Transición, $P = 0,008$ con Chaco Semi-árido).

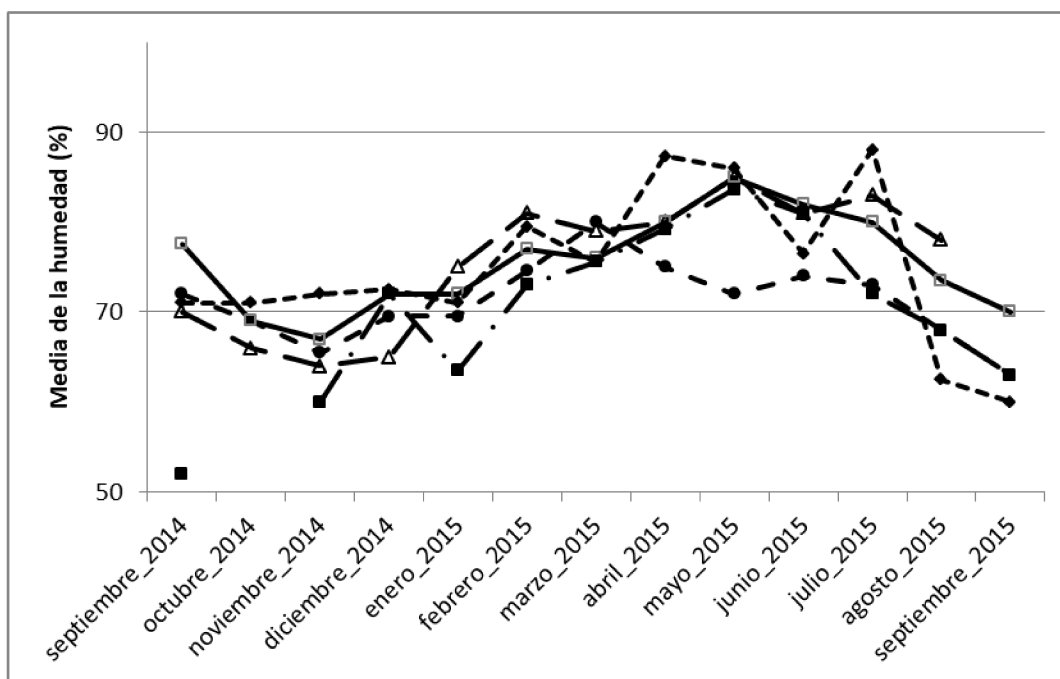


Figura 17. Media de la humedad relativa a lo largo de un año en las distintas regiones analizadas.

Se realizaron correlaciones de Spearman para determinar el grado de asociación entre las variables temperatura, humedad, población de abejas y celdas de cría analizadas en función de la prevalencia y el recuento de esporos de *Nosema* spp. Los resultados de dichas correlaciones indicaron que existió asociación entre la población de abejas y el recuento de esporos de *Nosema* spp ($P=0,011$), sin embargo el coeficiente de correlación fue muy bajo ($r^2=-0,092$).

Por otro lado, la temperatura estuvo asociada tanto al recuento de esporos ($P<0,001$) y a la prevalencia ($P<0,001$), pero nuevamente los coeficientes fueron bajos ($r^2=-0,27$ y $r^2=0,14$, respectivamente). La humedad también estuvo asociada con el recuento ($P=0,003$) y la prevalencia de esporos ($P=0,021$), observándose nuevamente valores bajos de coeficiente ($r^2=-0,10$ y $r^2=-0,089$, respectivamente). Las correlaciones significativas encontradas pueden deberse a la gran cantidad de datos involucrados en el estudio, sin embargo, los valores bajos de los coeficientes no permitirían explicar dichas asociaciones.

Relación entre las técnicas diagnósticas de la enfermedad (Recuento esporos/abejas y prevalencia).

Se realizó una correlación de Spearman entre el recuento y la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. Con base en este análisis, se pudo determinar una correlación significativa

entre ambas variables analizadas ($P < 0.001$), pero con un coeficiente de correlación bajo de 0,5 (Figura 18).

Para intentar predecir el valor de la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. en función del recuento de esporos de *Nosema* spp. se probaron varios modelos (lineal, logarítmico, inverso, cúbico y cuadrático). Un modelo de regresión cuadrática fue el que mayor correlación mostró ($P < 0,001$). Sin embargo, el valor de $r^2 = 0,342$ fue bajo para poder determinar una posible relación entre las variables analizadas.

Para obtener la Figura 18 se categorizó la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. resultando en cuatro categorías, menor o igual a 0,25; menor o igual a 0,50; menor o igual a 0,75 y menor o igual a 1. Esta transformación permitió visualizar la relación entre las variables de forma más clara. La información obtenida a partir de estos resultados estaría indicando que existe una relación débil entre ambas técnicas diagnósticas, al tener mayor recuento de esporos por abeja, se obtienen mayores prevalencias ($P < 0,001$). Del mismo modo, se puede predecir que al encontrarnos con prevalencias bajas e incluso hasta 0,75 de las muestras positivas a *Nosema* spp. en la prevalencia, los recuentos de esporos permanecen por debajo del 1.000.000 de esporas/abeja. Sin embargo, luego de pasar dicho valor de 0,75, el recuento de esporos puede dispararse hasta llegar a más de 4.500.000

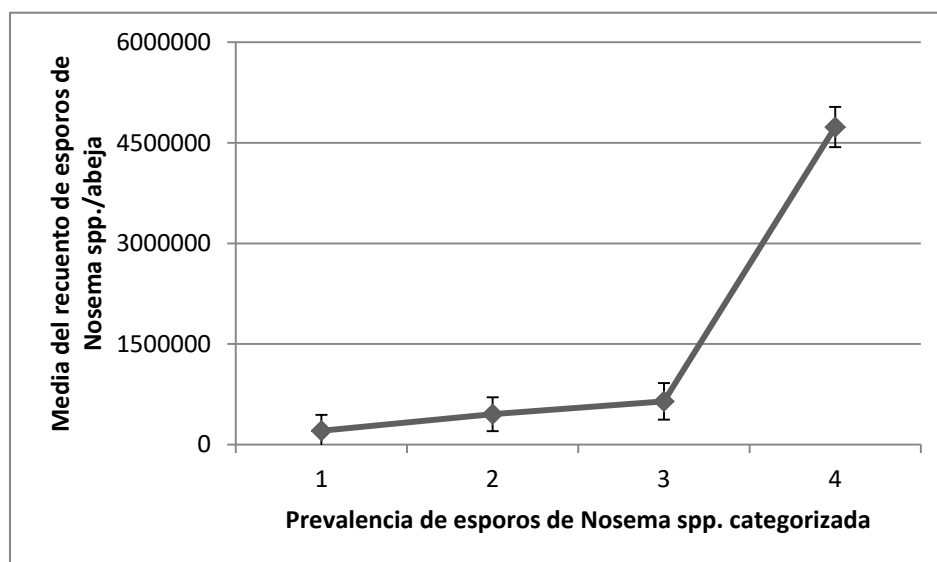


Figura 18. Relación entre la prevalencia de esporos de *Nosema* spp. categorizada y la media del log del recuento de esporos de *Nosema* spp. Referencias: 1= \leq a 0,25; 2= de 0,25 a \leq 0,50; 3= de 0,50 a \leq 0,75; 4= $>$ a 0,75.

Discusión

Al analizar los resultados de manera general, teniendo en cuenta las variaciones observadas regionalmente, pero sin tener en cuenta la diferenciación por apiarios, se puede distinguir un patrón relacionado ampliamente con lo observado en otras regiones de Argentina y del mundo [9, 64, 169]. El patrón observado en los meses de septiembre y julio, da cuenta de lo registrado en otras investigaciones [169, 181, 182, 183, 184], donde se pudo determinar que existen picos marcados en la primavera y en el otoño principalmente con relación a la especie *N. apis*. Con base en nuestros resultados y debido a que el año de estudio estuvo caracterizado por un invierno benigno, se observaron picos de otoño en meses de invierno (julio 2015).

Se ha documentado en muchos trabajos realizados en climas templados que las infecciones por *N. apis* tienen un ciclo estacional, con niveles máximos en la primavera, disminuyendo a lo largo del verano, seguido de un pico secundario antes de que los niveles disminuyan en el invierno y luego aumenten en la primavera [169, 181, 182, 183, 184]. En consecuencia, los niveles de infección tienden a disminuir en el verano debido a mecanismos de control dentro de la propia colonia, principalmente debido al aumento de la natalidad y a la reducción en la vida de las abejas [43].

Para el caso de la especie *N. ceranae* no se determinó aun la existencia de un patrón estacional ya que, para los estudios realizados en España, los niveles de este microsporidio varían con el tiempo, con niveles muy altos desde finales del verano hasta la primavera y picos máximos durante el invierno [61]. Sin embargo, por algunos factores aun no determinados, en Canadá se han informado los niveles más altos en verano [185], mientras que en Alemania fueron reportados durante la primavera [186]. En otros estudios realizados en Estados Unidos y en Uruguay, tanto los datos de recuento de esporas como los análisis de PCR sugirieron que *N. ceranae* presenta un ciclo de infección que alcanza su punto máximo a finales de primavera o principios de verano y luego disminuye durante el resto del año [93, 300], patrón similar al observado en Alemania [64] y a lo registrado para *N. apis* en el presente estudio.

Fries [5] ha sugerido que la estacionalidad de *Nosema* spp. puede depender de las condiciones climáticas. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, al

sacar la variación provocada por el factor apiario, se pudo observar una estacionalidad sumamente marcada en todas las regiones. Considerando que el trabajo se realizó en climas templados y subtropicales, no se pudo observar que la estacionalidad de *Nosema* spp. fuese particular para cada región tal como Fries [5] atribuye a las condiciones climáticas. No obstante, sí se observó una marcada reducción en los niveles de *Nosema* spp. dependiendo la región analizada. Para el caso de Santa Fe Sur y Centro, se determinaron valores elevados de prevalencia de esporos de *Nosema* spp., encontrando diferencias significativas al compararlo con las regiones de Chaco. Para el caso del recuento de esporos, se determinó diferencias significativas entre las regiones de Santa Fe y la región de Chaco Semi-árido las cuales presentaron niveles elevados, en comparación con las regiones de Chaco Húmedo y de Transición las cuales no tenían altos niveles, los cuales se encontraron a lo largo del año por debajo del millón de esporos.

Los datos para las regiones templadas (Santa Fe Sur y Centro) coinciden con lo observado en un trabajo realizado en Virginia, Estados Unidos, donde los niveles más altos de *Nosema* spp. se observaron justo antes y durante el pico de ingreso de néctar a la colmena [169]. Estas regiones presentan el patrón característico con abundante recuento de esporos en los meses de primavera y un pico más pequeño en los meses de otoño. La región de Santa Fe Sur presentó los niveles medios de temperatura más bajo y de humedad más altos entre las regiones evaluadas, lo que propicia ampliamente el desarrollo de la parasitosis. Las prevalencias más elevadas de *Nosema* spp. se encontraron asociados a regiones de alta humedad en distintas partes del mundo [187, 188, 189].

Para los climas subtropicales, existen pocos registros sobre estudios de Nosemosis. El dato aportado por el presente trabajo indica cargas bajas de infección en comparación a lo observado en las regiones de climas templado, particularmente en la región de Chaco Húmedo y Chaco de Transición. Estas diferencias marcadas con relación a las cargas de esporos en distintas condiciones climáticas se asocian, en parte, a la dinámica de la colmena y la parasitosis. Dado que la Nosemosis invade las células del ventrículo de las abejas, es preciso que la membrana peritrófica, primera barrera que presentan las abejas en su intestino medio, se encuentre debilitada. Esta condición suele darse cuando la disponibilidad alimenticia es reducida, situación que ocurre en menor proporción en los ambientes de clima subtropical, donde la disponibilidad floral es elevada y abundante durante todo el año. Por otro lado, en este tipo de ambientes los individuos de las colmenas no suelen tener períodos prolongados de encierro y existe normalmente un

mayor índice de natalidad, generando abejas jóvenes y de vida corta de manera continua. Lo anterior difiere de lo que ocurre con las abejas en climas templados, las cuales pueden permanecer largos períodos de tiempo confinadas en las colmenas durante las épocas invernales, lo que favorece el contacto permanente entre las mismas y aumenta el contagio de la parasitosis [43,189].

Cabe aclarar que los resultados obtenidos para el Chaco Semi-árido, no concuerdan con lo presentado para el caso de las regiones de Chaco Húmedo y de Transición, pudiendo observarse en los meses de julio y agosto niveles muy elevados de la parasitosis. En cuanto a las condiciones climáticas de la región cabría esperar que sea la que menor incidencia de la enfermedad presente, ya que debería corresponder a la región más seca y con mayor temperatura a lo largo el año. Sin embargo, no se observó la tendencia mencionada, ya sea por las condiciones climáticas que no se presentaron de la manera esperada (registró mayor humedad que otras regiones), como por alguna técnica de manejo (suplementación proteica, recambio de reinas, etc.) que se analizará en los capítulos siguientes con mayor detalle.

Se determinó la relación entre las técnicas de análisis de muestras, mediante prevalencia o recuento de esporos de *Nosema* spp./abeja. Ambas técnicas suelen ser difíciles de implementar de manera sistemática para los estudios de *Nosema* y, en estos casos, donde el número de muestras es demasiado elevado suele complicar el análisis.

Se constató la asociación positiva existente entre ambas técnicas. Sin embargo, el coeficiente de correlación no fue muy elevado. Esto podría estar indicando que la relación existente entre ambas técnicas está dada por la cantidad de muestras analizadas y no por una correlación real entre ambas. Se han realizado estudios para determinar la correlación entre ambas técnicas de muestreo y los resultados han variado de acuerdo a una multiplicidad de factores. En algunos, no se han encontrado correlaciones significativas entre la intensidad de la infección por *N. ceranae* (recuento) y el porcentaje de abejas infectadas en muestras compuestas (abejas de distintas edades). Los autores de estos trabajos [198] afirmaron que no es posible estimar con precisión la incidencia de la enfermedad según la intensidad de la infección en muestras compuestas, asumiendo que las muestras de abejas individuales son más precisas para diagnosticar los niveles de infección de una colonia y que lo ideal sería utilizar métodos de PCR para el análisis [118]. Sin embargo, y debido a los altos costos que representan este tipo de análisis es poco probable que se emplee de manera generalizada. Por otro lado, el análisis individual lleva

mucho más tiempo que el muestreo compuesto, por lo que el muestreo compuesto es más eficiente para grandes esquemas de muestreo [190].

En otros trabajos, utilizando menor número de abejas no se encontró una correlación entre el recuento de esporos por abeja y el porcentaje de abejas debido al alto número de esporas presentes en unas pocas abejas [174]. Este enfoque se relaciona ampliamente con lo obtenido en el presente trabajo, donde una muestra con pocas abejas muy infectadas puede generar el mismo recuento de esporas que una muestra con muchas abejas moderadamente infectadas [177]. Otra cuestión a tener en cuenta es que pocos esporos pueden ser incluso indetectables con técnicas de PCR, pero lo relevante es que tan bajos niveles de infección no son económicamente significativos [190].

Por otro lado, se han realizado trabajos donde el coeficiente de correlación de ambas técnicas fue significativo para muestras compuestas para determinar *N. apis* [175, 177,191,192], dichos coeficientes estuvieron entre 0,75 y 0,83. Resultados similares se obtuvieron al comparar muestras compuestas y porcentaje de abejas infectadas con infecciones de nivel bajo a moderado [89]. Al categorizar las variables prevalencia de esporos de *Nosema* spp. se pudo obtener una relación fuertemente significativa entre las técnicas ($P<0,001$), lo que indicó que al encontrarnos con valores superiores a 0,75 de prevalencia de esporos de *Nosema* spp. los recuentos superan el 1.000.000 de esporos/abeja pudiendo llegar a valores de más de 4.500.000 esporos/abeja. Sin embargo, no fue posible encontrar relación entre los niveles altos de *Nosema* spp. y el estado de las colmenas.

Sería apropiado realizar futuros estudios que intenten desarrollar nuevas técnicas que puedan complementar las ya existentes y que permitan brindar una respuesta más precisa a los productores que se encuentran con la patología.

Conclusiones

- ✓ Se determinó un patrón de recuento y prevalencia de esporos de *Nosema* spp. que fue similar en todas las regiones con diferencias en las intensidades
- ✓ Dicho patrón estuvo fuertemente relacionado con lo que se ha descrito para la especie *N. apis*.

- ✓ En relación a las diferentes intensidades registradas en las regiones analizadas se determinó una mayor abundancia en las regiones de clima templado y en una región singular de clima subtropical. Se pudo describir la parasitosis empleando dos técnicas de análisis.
- ✓ Existe una débil asociación entre dichas técnicas. Siendo complementarias, pero se deben realizar estudios más precisos que permitan determinar una forma más rápida y precisa de diagnosticar la parasitosis.

**Capítulo III: Caracterización genética de
ejemplares de *Nosema* spp. con relación a las
regiones agro-ecológicas y a la diversidad
genética de *Apis mellifera****

* Pacini, A., Mira A., Molineri A., Giacobino A., Bulacio Cagnolo N., Aignasse A., Zago L., Izaguirre M., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Pietronave H., Russo R., Scannapieco A., Lanzavecchia S., Schnittger L., Signorini M. 2016. Distribution and prevalence of *Nosema apis* and *N. ceranae* in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 141: 34–37.

Introducción

Nosema apis [184] fue considerado el único agente etiológico causante de la Nosemosis en *Apis mellifera* L. hasta 2005, cuando adicionalmente *N. ceranae* se identificó en abejas europeas [3]. Previo a ese hallazgo, se pensaba que *N. ceranae* solo infectaba de manera natural a las abejas asiáticas (*Apis cerana*) cuando se describió por primera vez en la década de 1990 [28].

Luego de ser identificado en *A. mellifera* [3], se realizaron estudios en España que determinaron que *N. ceranae* era altamente virulenta en abejas enjauladas [193] y la infección se correlacionaba con el colapso de colonias en el campo [66]. Dicha virulencia podría atribuirse a que los patógenos que atraviesan con éxito las barreras de las especies hospedadoras pueden ser más virulentos para sus nuevos hospedadores que las especies con las que evolucionaron conjuntamente [12].

Se han identificado ventajas competitivas con relación a los factores de virulencia para *N. ceranae* al comparar su genoma con el de *N. apis* [108, 194]. Existen etapas sexuales crípticas en el ciclo de vida de *N. ceranae*, debido a la presencia de loci y genes relacionados con el sexo, involucrados en la recombinación meiótica [205]. El importante intercambio genético detectado en *N. ceranae* [206] tiene importantes implicaciones evolutivas, porque permite eliminar más mutaciones perjudiciales eficientemente y proporciona una mejor capacidad para adaptarse a nuevos entornos u hospedadores [207, 208]. Otra ventaja adaptativa de *N. ceranae*, que se ha documentado en poblaciones de abejas europeas, se relaciona con el potencial biótico de esta especie con relación a la tolerancia de sus esporas para soportar temperaturas de hasta 60°C, combinadas con resistencia a la desecación [195, 200]. Pero, en contraste, se ha reportado que son sensibles a las temperaturas de congelación [5,64,201], lo que sugiere que la virulencia de *N. ceranae* en la población de abejas europeas está influenciada por el clima y podría modificarse con los cambios climáticos [64].

Actualmente, ambas especies de *Nosema* tienen una distribución global, pero existen variaciones temporales y regionales en la prevalencia además de las tasas de colmenas infectadas individualmente y co-infectadas [202, 203, 204]. Algunos estudios sugieren que *N. ceranae* estaría desplazando a *N. apis*, especialmente en zonas con condiciones climáticas templadas [6, 39, 60, 161, 205, 206]. Se han realizado estudios para determinar

efectos de competencia entre ambas especies, pero no demostraron ninguna ventaja competitiva por alguna de ellas [65]. Sin embargo, un estudio realizado por Natsopoulou y colaboradores [207], demostró que la ventaja ocurre cuando la infección comienza con *N. ceranae* y luego aparece *N. apis*. Este hallazgo no explicaría el desplazamiento de una especie sobre otra, pero sí el efecto de que *N. ceranae* presenta cierta ventaja competitiva cuando se encuentra establecido en un hospedador. Aparentemente las variables ambientales y la competencia inter-específica son elementos importantes para realizar modelos matemáticos que ayudan a explicar las diferentes prevalencias de *Nosema* spp. en distintas regiones climáticas [207].

Existen numerosos estudios, mayormente realizados en laboratorio, que han documentado la prevalencia de *Nosema* spp. Algunos de éstos, principalmente los realizados en España, sugieren una mayor prevalencia y virulencia de *N. ceranae* [35, 61, 83, 98,161]. No obstante, otros países europeos y norteamericanos han informado hallazgos contradictorios. Por un lado, existen trabajos en Canadá que indican que *N. ceranae* provoca la muerte de las colmenas y es el agente causal de la Nosemosis en la mayoría de las colmenas y a su vez se encontró altamente influenciado por co-infecciones con otros patógenos [160,164, 208, 209]. En otros estudios, como el realizado en Serbia por Stevanovic y colaboradores [203], indican que *N. ceranae* es casi ubicua y la única especie de microsporidios que infecta a *A. mellifera*, pero no está asociado con la pérdida de colonias. En otros países, como Bélgica [210], se reportó a *N. ceranae* como factor causante del colapso de las colmenas. En Alemania y en Suecia se ha detectado a *N. apis* como la especie más prevalente, pero ninguna de las dos especies se asoció con la mortalidad invernal [64, 65].

De acuerdo con informes variados en toda Europa y en regiones de Estados Unidos, la distribución de *N. apis* y *N. ceranae* y la intensidad de la infección varían estacional y regionalmente. No obstante, la relación causal entre la infección por *Nosema* spp. y la pérdida de colmenas solo fue sugerida en algunas regiones de Europa [66, 203].

Es escasa la información disponible sobre la distribución de las especies de *Nosema* spp. en América del Sur en diferentes condiciones climáticas [59, 211, 212]. En todos los casos, indican una mayor prevalencia y distribución geográfica de *N. ceranae*. En Argentina existen registros de distribución de especies de *Nosema* spp. en regiones templadas del centro-sur del país [8, 211, 213]. Con base en los resultados en estas regiones y como se

ha reportado en otros lugares del mundo, existen ciertas contradicciones con relación al efecto real sobre la mortandad de abejas en manos de la Nosemosis [7, 8, 214].

Otro factor que podría estar modificando la prevalencia de las especies de *Nosema* que parasitan las abejas es el tipo de hospedador. Las subespecies de *A. mellifera* se dividen en cuatro grupos principales, respaldados por estudios morfométricos y genéticos, además de análisis de rasgos ecológicos, fisiológicos y de comportamiento [215]: grupo A, que incluye subespecies en toda África; grupo M, que incluye subespecies del oeste y norte de Europa; grupo C, que incluye subespecies de Europa oriental; y el grupo O, que incluye especies de Turquía y Oriente Medio [216, 217, 218]. En Argentina se ha documentado una mayor proporción de haplotipos de linajes A, en el norte del país, con relación a una mayor proporción de subespecies del grupo C en el centro y sur del país [219, 220, 221]. Las abejas europeas exhiben adaptaciones morfológicas y de comportamiento para sobrevivir a los inviernos más fríos, mientras que las abejas africanas son más agresivas y muestran una mayor tendencia a enjambrar. Por otro lado, se han detectado diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades, siendo las abejas africanas más resistentes al ácaro patógeno *Varroa destructor*, el principal patógeno de las abejas en la actualidad [223].

Conocer la distribución de las especies de *Nosema* spp. en las distintas poblaciones de *A. mellifera* de regiones subtropicales y templadas de Argentina, brindará información acerca de la influencia ambiental en dicha distribución y mayores herramientas para controlar la enfermedad.

Objetivos

1. Caracterizar a nivel molecular poblaciones de *Nosema* spp. presentes en apiarios de las regiones agroecológicas de Santa Fe, Chaco y Formosa.
2. Caracterizar los haplotipos de las diferentes poblaciones de *Apis mellifera* presente en los apiarios bajo estudio en las diferentes regiones agro-ecológicas.
3. Asociar los diferentes haplotipos de *A. mellifera* con las especies de *Nosema* spp. identificadas.

Materiales y métodos

Diseño del estudio y tamaño de muestra

Se realizó un estudio transversal durante la post-cosecha de miel, abarcando el período desde febrero a junio de 2015, en apiarios localizados en el centro-norte de Argentina, específicamente en las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa. Un total de 361 colmenas de 59 apiarios propiedad de diferentes apicultores fueron muestreados. El tamaño de muestra se calculó considerando que hay un número estimado de 5300 colmenares en el área de estudio y una prevalencia esperada de *Nosema* spp. de 86,1% [8] con un nivel de confianza del 95% y una precisión <10%. Se definieron cinco regiones agroecológicas basadas en el período de flujo de néctar, el cronograma de manejo apícola, la categorización de regiones agroecológicas [135, 138] y prácticas agrícolas [137]: Santa Fe Sur y Centro (regiones de clima templado), Chaco Húmedo, de Transición y Semi-árido (regiones de clima subtropical) (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de las regiones agro-ecológicas analizadas.

Región Agro-ecológica	Temperatura media anual (°C)	Precipitación media anual (mm)	Usos de la tierra	Flujo de Néctar/Polen	Principal Vegetación circundante
Sur de Santa Fe	18	600-1100	Soja, maíz y trigo	Corto (menos de tres meses)	Monte y cultivo
Centro de Santa Fe	17-18	800-900	Tambos, animales de invernada en pasturas de alfalfa	Intermedio (tres–cuatro meses)	Monte y cultivo
Chaco Húmedo	23	> 1200	Granjas pequeñas ganadería, producción forestal o arrocera	Largo (entre 9 a 10 meses)	Monte y pastizal
Chaco de Transición	23-24	< 1000	Cultivo de cereales, oleaginosas algodón y ganadería	Largo (entre 9 a 10 meses)	Monte y pastizal
Chaco Semi-Árido	23	550-800	Producción forestal	Largo (entre 9 a 10 meses)	Monte y pastizal

Los colmenares fueron elegidos al azar después de un procedimiento de aleatorización estratificada [224]. La proporción de colmenares se distribuyó según el número oficialmente registrado de colmenares en cada región agroecológica.

Dentro de cada apiario, un mínimo de seis colonias o el 10% de las colmenas totales [195] fueron seleccionadas al azar.

Empleando el protocolo de monitoreo y remisión de ejemplares reportado por Sarlo [7]. De cada colmena se tomaron 100 abejas retornantes del vuelo directamente de la piquera empleando frascos plásticos conteniendo 60 ml de alcohol 96%. La suspensión de esporos se preparó macerando 60 abdómenes de abejas seleccionadas aleatoriamente. El número de recuentos de esporos de *Nosema* spp./abeja fue determinado mediante microscopio óptico y hemocitómetro. De cada muestra se contó el número de esporos contenido en 80 cuadros del hemocitómetro (5 grupos de 16 cuadros) siguiendo la metodología reportada por Cantwell [110] y modificada por Del Hoyo [180]. Esta metodología de muestreo es la empleada tradicionalmente para estimar la intensidad de la infección y permite detectar hasta un mínimo de 5% de abejas infectadas con un 95% de confianza [48].

Identificación de especies de Nosema spp.

En el laboratorio de Parasitología de INTA Castelar se realizó la identificación de las especies de *Nosema* spp. Se extrajo ADN de 50 abejas por colmena usando un Kit de extracción de ADN, DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) según el protocolo del fabricante. Se utilizó el par de cebadores *N. apis* - sentido (5'-CCATTGCCGGATAAGAGAGT-3') y *N. apis* - antisentido (5'-CCACCAAAACTCCCAAGAG-3') con 269 pb de *N. apis*. El par de cebadores, *N. ceranae* - sentido (5'-CGGATAAAAGAGTCCGTTACC-3') y *N. ceranae* - antisentido (5'-TGAGCAGGGTTCTAGGGAT-3'), presenta 250 pb de *N. ceranae*. La PCR específica de especie se llevó a cabo como se describe en Chen y colaboradores [49].

Determinación de haplotipos de Apis mellifera

Con el fin de analizar la variabilidad genética de *A. mellifera*, se tomó una muestra representativa de abejas individuales por colmena en cada región agro-ecológica. Del total de los 59 apiarios muestreados previamente, fueron seleccionados 27 y de ellos se enviaron abejas adultas de 130 colonias, para ser analizadas en el Laboratorio de Genética

de Insectos de Importancia Económica, Instituto de Genética Ewald A. Favret ubicado en INTA Castelar.

El ADN total fue aislado de las patas posteriores de dos abejas melíferas, como se describe en] Baruffi et al. (1995). La citocromo oxidasa I-citocromo oxidasa II, región intergénica (COI-COII) del genoma mitocondrial de *A. mellifera* fue amplificado usando los cebadores descritos por Crozier y Crozier [225] y Lobo Segura [226]. Los productos de amplificación obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción *Hinfl* según protocolo puesto a punto en el laboratorio de Insectos de Importancia Económica [227]. Posteriormente se analizaron los patrones de restricción para la determinación del haplotipo correspondiente a cada muestra.

Análisis estadístico

Diferencias en la presencia de las especies de *Nosema* spp. y recuento de esporas por abeja se compararon usando modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) incluyendo la región como efectos fijos, el apiario como efecto aleatorio y empleando las funciones de enlace adecuadas para cada variable dependiente en función de su distribución de frecuencias. Por otro lado, se realizó la comparación entre especies de *Nosema* spp. y el haplotipo de abeja identificada utilizando el test Chi-cuadrado de Pearson (χ^2). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando InfoStat [228].

Con el objetivo de visualizar de manera precisa la distribución geográfica de las especies de *Nosema* spp. y los haplotipos de *A. mellifera*, se realizaron mapas a partir del Sistema de Información Geográfica QGIS 2.18.0 [229] utilizando las coordenadas geográficas originales de los apiarios donde se realizaron los muestreos y la información correspondiente, y la relación entre las mismas.

Resultados

Prevalencia y niveles de infestación con Nosema spp.

Según lo determinado por el recuento de esporas, *Nosema* spp. se encontró en 64% de las colmenas muestreadas. En las regiones agro-ecológicas de clima templado, el 91,5% y 70% de las colmenas resultaron positivas para *Nosema* spp. en Santa Fe Sur y Centro, respectivamente. En las regiones agro-ecológicas de clima subtropical *Nosema* spp. fue menos prevalente, con porcentajes de 30%, 30% y 35% en las colmenas de Chaco

Húmedo, Semi-árido y de Transición, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre los niveles de infestación con *Nosema* spp. de las regiones templadas y subtropicales, siendo menores los niveles en las regiones subtropicales ($P < 0,001$). Las cargas más altas se dieron en Santa Fe Sur (993.482 ± 157.2635), luego el Centro de Santa Fe ($625.125 \pm 1.814.140$), seguido por las regiones de Chaco Semi-árido (80.999 ± 354.330), Chaco de Transición (76.873 ± 232.626) y por último Chaco Húmedo (47.193 ± 263.546).

Identificación de especies de *Nosema* spp.

Diagnósticos diferenciales empleando PCR demostraron una exclusiva infección por *N. ceranae* en 37,8% de todos los apiarios, mientras que en 26,7% de los apiarios solo estaban infectados por *N. apis*. El resto, 35,6% de los apiarios, se encontraron co-infectados por ambas especies de *Nosema* (Figura 1).

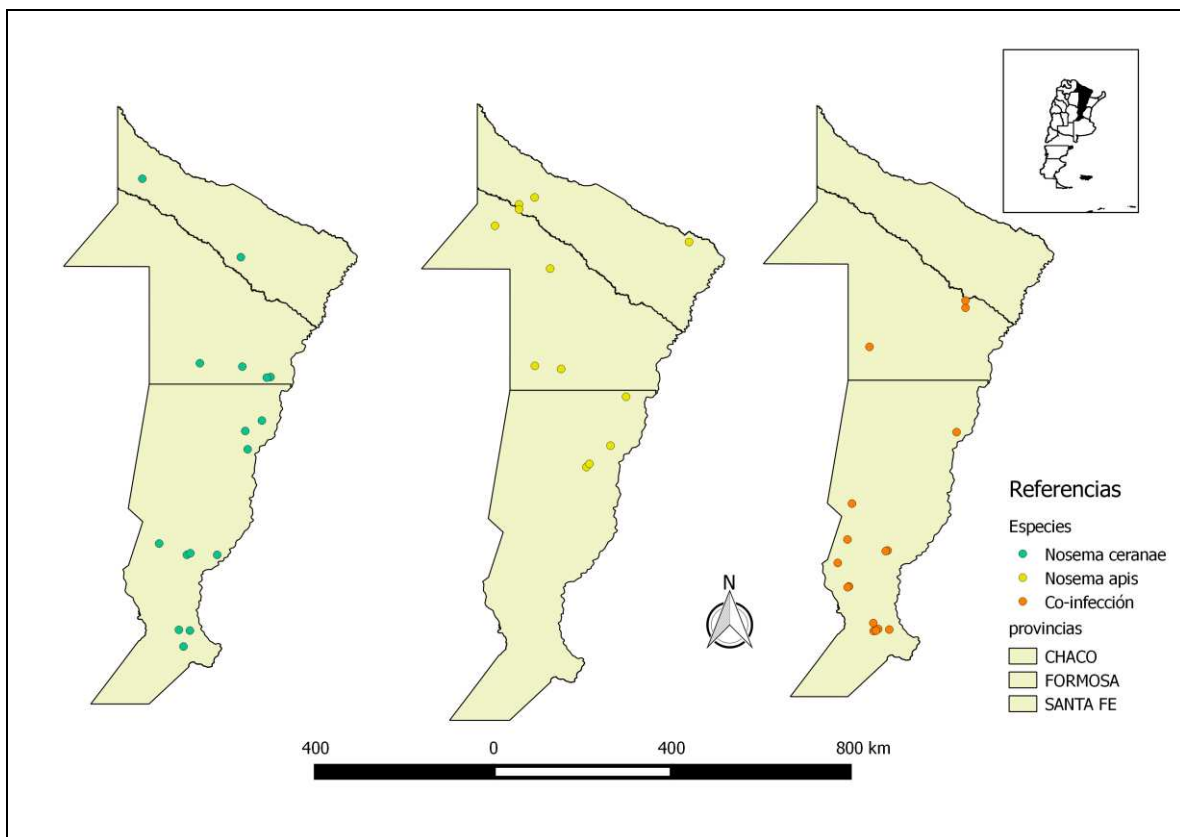


Figura 1. Especies de *Nosema* presentes en los apiarios monitoreados.

Un análisis de distribución mostró que los apiarios exclusivamente infectados por *N. ceranae* y los que presentaban co-infecciones se encontraban en todas las regiones analizadas. La co-infección fue más prevalente en regiones con climas templado (77,9%) en comparación con aquellos del clima subtropical (22,1%) ($P < 0.001$). Por el contrario, los apiarios que solo estaban infectados con *N. apis* se identificaron exclusivamente en regiones agro-ecológicas de clima subtropical, Chaco Húmedo (45,5%), Transición (14,5%), con mayor predominio en la región de Chaco Semi-árido (75%) (Figura 2).

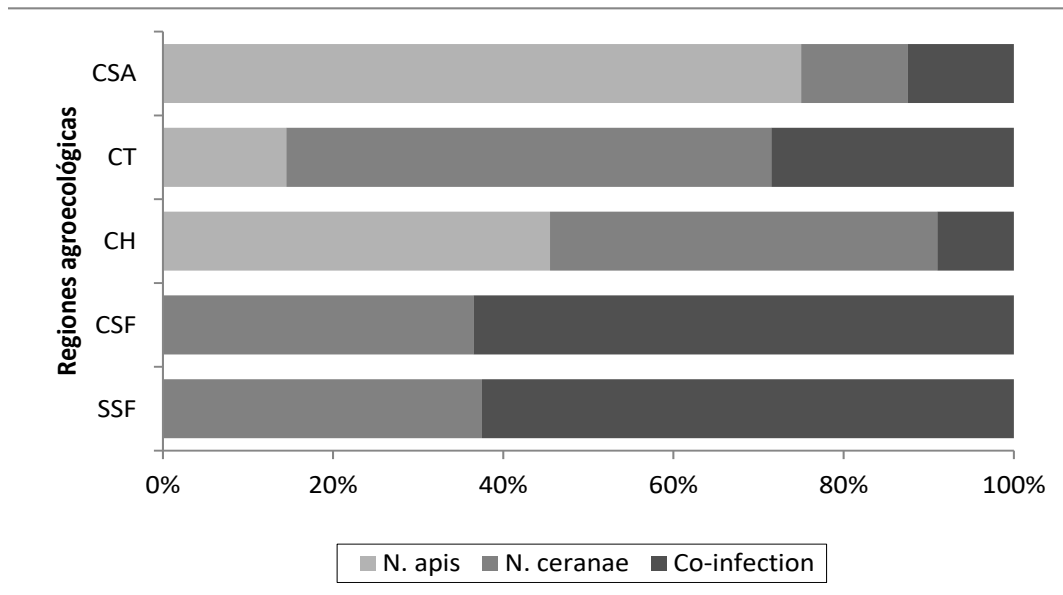


Figura 2. Porcentaje de colmenas infectadas con *N. ceranae*, *N. apis*, co-infección por cada Región Agro-ecológica. CSA=Chaco Semi-árido, CT= Chaco de Transición, CH= Chaco Húmedo, CSF= Centro de Santa Fe, SSF=Sur de Santa Fe.

Una asociación altamente significativa ($P < 0,001$) entre las distintas especies de *Nosema* spp. y los niveles de infestación (determinado mediante el recuento de esporas de *Nosema* spp./abejas) fue hallada. Aquellas colmenas exclusivamente infectadas con *N. apis* presentaron recuentos promedios de 9×10^4 esporas/abeja, mientras que las colonias donde solo se encontró *N. ceranae* o co-infección los recuentos de esporas fueron superiores, alcanzando $6,5 \times 10^5$ y $7,8 \times 10^5$ esporas/abejas, respectivamente. Se pudo observar que cerca de 70% de las colmenas que estaban infectadas solo con *N. apis* presentaban

menos de 100.000 esporos/abeja, a diferencia de lo observado para las colmenas que tenían co-infección o sólo estaban infectadas con *N. ceranae*, donde dicha proporción fue de 20% y 30%, respectivamente (Figura 3).

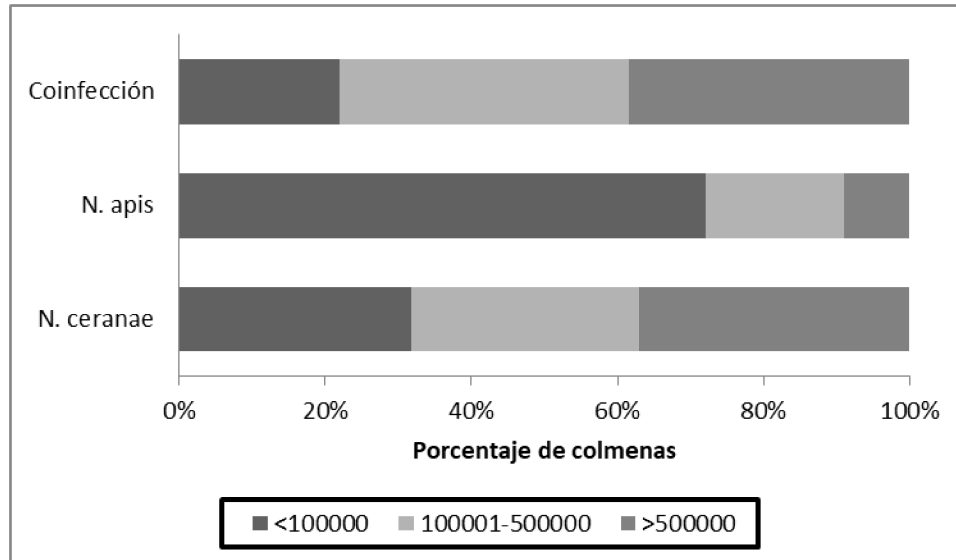


Figura 3. Porcentaje de colmenas con diferentes niveles de esporos de *Nosema* spp. en función de la especie encontrada.

Haplotipos de abejas

En las muestras se determinaron abejas del linaje europeo C (haplotipos C1 y C2j) y el linaje africano A (haplotipos A1 y A4). Se encontró una asociación significativa entre las regiones climáticas y la distribución de los haplotipos de *A. mellifera* ($P < 0,001$). El haplotipo derivado de linaje europeo se determinó en 75% de las muestras de regiones agro-ecológicas con clima templado mientras que el 71% de las muestras de las regiones de clima subtropical fueron identificados como linajes de haplotipos derivados de abejas melíferas de África. En el Sur de Santa Fe, solo se encontraron los haplotipos C1 y A4. Las muestras del Centro de Santa Fe, no estuvieron representadas por el haplotipo A1. El resto de las regiones presentaron muestras con los cuatro haplotipos de abeja. Se encontró una asociación significativa entre el haplotipo de abejas y el recuento de esporos de *Nosema* spp. ($P=0,027$), siendo los haplotipos africanizados los que presentaron menor cantidad de esporos de *Nosema* spp (47.464 ± 195.245 esporos/abeja) en comparación con los europeos ($951.442 \pm 2.690.580$ esporos/abeja).

Se realizó un mapa de distribución de los linajes europeos y africanizados (Figura 4 A), donde se observa que los haplotipos de linaje africano son más comunes en las regiones de Chaco, a diferencia de los haplotipos europeos que están presentes mayormente en regiones de centro y sur de Santa Fe. Por otro lado, no se encontraron asociaciones significativas entre *Nosema* spp. y el haplotipo de *A. mellifera* ($P= 0,463$). La Figura 4 B muestra las combinaciones posibles entre haplotipo de abeja y especie de *Nosema* spp. la distribución de las posibles combinaciones no permite determinar un patrón entre las especies y los haplotipos en las diferentes regiones analizadas.

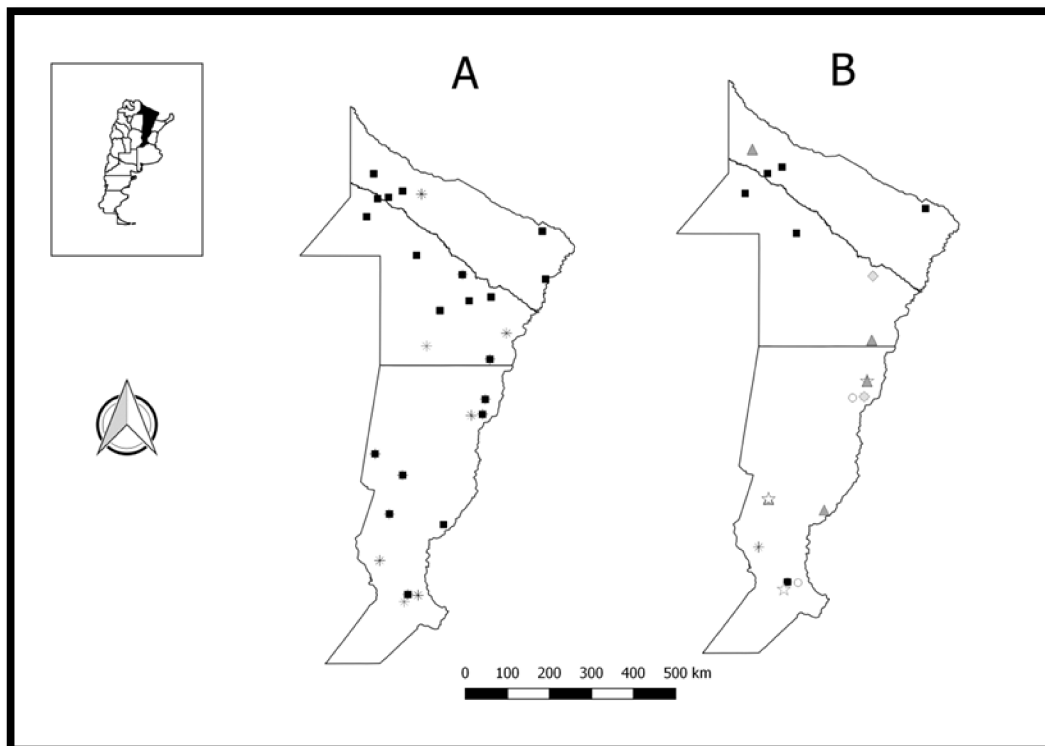


Figura 4. (A). Distribución de los linajes europeos (cuadrados negros) y africanizados de abejas (cruces). (B). Distribución de las especies de *Nosema* spp. y los linajes de abejas encontrados. Europeo vs. Co-infección = cruz; Africanizado vs. Co-infección = rombo gris; Europeo vs *N. apis* = círculo blanco; Africanizado vs. *N. apis* = cuadrado negro; Europeo vs. *N. ceranae* = estrella blanca; Africanizado vs. *N. ceranae* = triangulo gris.

Discusión

La distribución geográfica de *Nosema* spp. presentó tres patrones característicos: (i) la presencia de colmenas infectadas puramente con *N. ceranae* en todas las regiones estudiadas, (ii) la presencia de colmenas con infección exclusiva con *N. apis* en regiones de climas subtropicales y (iii) una proporción significativamente mayor de co-infección en las regiones de clima templado del estudio.

El presente trabajo mostró una mayor proporción de apiarios infectados con *N. ceranae* que con *N. apis*, como se ha documentado en muchas regiones del mundo [4, 61, 62, 63, 83, 99, 161, 203, 208, 209, 230, 241], cerca de 40 y 60% de las colmenas muestreadas en cada región, presentaban solo infecciones con *N. ceranae*, a excepción del Chaco Semi-árido que sólo presentó 12% de las colmenas infectadas exclusivamente con *N. ceranae*.

Al considerar los resultados de *N. ceranae*, se puede indicar que se ha reportado que esta especie presenta ciertos inconvenientes para germinar por debajo de 4°C, disminuyendo su poder germinativo en regiones climáticas caracterizadas por una estación invernal fría [64]. Para el caso del presente trabajo, el momento del año en el que se realizó el muestreo correspondió al final del verano, principios de otoño, siendo la temperatura mínima registrada de 19°C. Esto podría explicar en parte la mayor ocurrencia de *N. ceranae* en las regiones analizadas.

Con relación al segundo patrón observado, se determinó una fuerte ocurrencia de *N. apis*, principalmente en regiones de clima subtropical durante el período de muestreo. Estos resultados no están representados de la misma forma en trabajos recientes de regiones más frías de Argentina, las cuales indican una prevalencia casi exclusiva de la especie *N. ceranae* en contraste con *N. apis* [211, 250]. Por otro lado, el resultado obtenido en el presente trabajo parece estar en contraste con la idea de que *N. ceranae* es más competitivo que *N. apis* en climas más cálidos [64, 65]. En relación a lo mencionado previamente, estos resultados pueden estar en consonancia con la época del año en la que se realizó el estudio, ya que las temperaturas en las distintas regiones en dicha época (fines del verano) pueden ser propicias para el desarrollo de ambas especies de microsporidios, indistintamente. En relación a esta hipótesis, la temperatura mínima registrada fue de 19 °C y la máxima de 37 °C, esta temperatura máxima podría estar en desventaja con la especie *N. apis*, ya que se conoce que presenta un desarrollo óptimo entre los 30-35°C [47], y por tal motivo podría existir esa diferencia entre ambas especies en las proporciones observadas.

Por otro lado, estas diferencias observadas entre la distribución de ambas especies podrían dar cuenta de un posible desplazamiento de *N. ceranae* sobre *N. apis*, como ya se ha registrado en algunas regiones del mundo [4, 5, 6, 39, 230], dado que se observó una mayor proporción de *N. ceranae* en las regiones del sur (Santa Fe Sur), con aumento de las prevalencias de *N. apis* al norte (regiones de Chaco) y de las co-infecciones en el centro (Centro de Santa Fe). Esta hipótesis también puede estar respaldada por un mayor transporte de abejas entre las regiones del centro del país, dado el mayor desarrollo de la actividad, en comparación con las regiones del Norte, el movimiento de abejas entre distintas regiones del país y del mundo puede y ha incentivado la rápida dispersión, no sólo de *N. ceranae* [38] sino también de otros parásitos, como el caso de *Varroa destructor* [41].

Otro de los resultados obtenidos fue que aquellas colmenas que solo estaban infectadas con *N. apis* presentaban menor número de esporos, este hallazgo ya ha sido registrado en estudios realizados en Canadá, donde los niveles de infección de colonias parasitadas por *N. apis* fueron más bajos que los registrados para *N. ceranae* [209]. Williams [233] y Huang y Solter [102] realizando estudios en laboratorio, determinaron mayores cargas de esporos de *N. ceranae* comparado con *N. apis*. Según estos autores esto podría ser el resultado de que *N. ceranae* produce una multiplicación rápida y una alta inversión en esporas de resistencia ambiental por que no reinfectan las células del epitelio pero resisten un tiempo en el recto hasta que se liberan en el ambiente con las heces. Por otro lado, las regiones más cálidas presentan una menor incidencia de la Nosemosis, esto podría explicar la menor abundancia de esporas registradas en dichas regiones.

Para el tercer patrón registrado, las co-infecciones fueron más prevalentes y presentaron mayor conteo de esporos que las infecciones simples. Este último resultado coincide con lo reportado por otros autores, los cuales indicaron mayor abundancia de esporos en abejas co-infectadas [209, 234], sugiriendo un efecto sinérgico entre ambos microsporidios que pueden provocar un impacto más fuerte sobre la salud de las abejas [209]. En este sentido, se ha demostrado que las infecciones mixtas disminuyen la supervivencia de las abejas, pudiendo deberse a una mayor producción de esporas dentro de las abejas infectadas, las cuales pueden infectar diferentes sistemas moleculares o fisiológicos de las abejas [234]. Según un estudio realizado por Notasopolou y colaboradores [207], al infectar abejas con ambas especies en simultáneo, no se observaba la competencia entre estos microsporidios parásitos. Sin embargo, en caso de colocar una especie primero y luego

otra se determinó que el efecto de la competencia se observaba y dependía fuertemente de la secuencia de infección, beneficiando al parásito preestablecido que inhibe el desarrollo del segundo parásito. Adicionalmente, estos autores pudieron determinar un mayor efecto inhibitorio de *N. ceranae* sobre *N. apis*. Estos resultados podrían aportar a la idea de que *N. ceranae* estaría inhibiendo el desarrollo de *N. apis*, dada la alta prevalencia de co-infección y *N. ceranae* con relación a *N. apis* en las regiones agro-ecológicas de clima templado estudiadas y las mayores prevalencias de *N. apis* encontradas en climas subtropicales. Lo anterior está sustentado en los resultados obtenidos por otros investigadores de Argentina, que analizaron muestras de la región sur del país (Sur de la provincia de Buenos Aires) obteniendo más de 98% de muestras positivas a *N. ceranae* [211] y que en esta zona de transición entre clima templado y subtropical se está dando la posible competencia entre las especies en estudio. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser probada en futuros estudios y con más resultados a lo largo del tiempo.

Respecto a la genética del hospedador (*A. mellifera*) y su posible asociación con las especies de *Nosema*, este análisis se realizó, dado que se ha propuesto que el origen genético de las abejas podría ser un factor que explica los patrones de distribución observados de *Nosema* spp. [115]. Los haplotipos africanizados de *A. mellifera* fueron más comunes en las regiones agro-ecológicas de clima subtropical que en las templadas, como lo sugirió un estudio previo [219]. Sin embargo, en el presente trabajo, no se han podido encontrar asociaciones significativas entre los distintos haplotipos de *A. mellifera* y las especies de *Nosema* spp. Otros trabajos publicados, presentaron los mismos resultados que lo indicado en el presente estudio, donde al analizar diferencias entre las frecuencias de especies de *Nosema* spp. entre poblaciones naturales de abejas africanizadas y europeas no encontraron diferencias [204]. Puede que las distintas poblaciones de *A. mellifera* se encuentren infectadas de manera equitativa por ambos parásitos. No obstante, es posible que el uso de una muestra con un número más alto y un diseño de estudio mejorado podrían revelar tal asociación genética entre haplotipos de abejas y especies de *Nosema*. Por otro lado, en este estudio pudo determinarse una relación significativa entre los haplotipos de abeja y los niveles esporulares de *Nosema* spp. ($P=0,027$), siendo las abejas europeas las que presentaron mayor número de esporos en comparación con las abejas africanizadas. Existen estudios que apuntan a describir la mayor tolerancia de abejas africanizadas a diferentes patógenos, como es el caso de *V. destructor* [235, 236, 237]. Para el caso particular de *N. ceranae*, un trabajo realizado en Uruguay comparó el

desarrollo de la infección con dicho microsporidios en abejas africanizadas e italianas (*A. mellifera ligústica*) y determinaron que las abejas africanizadas tienen la capacidad de limitar el nivel de infección en una colonia, debido posiblemente a que las abejas africanizadas presentan una vida más corta que hace que el parásito no llegue a desarrollarse en el interior de las abejas [115, 238, 239]. En relación a estos resultados deberían profundizarse los estudios para corroborar la hipótesis presentada en dicho estudio.

Conclusiones

- ✓ Se determinó un gradiente creciente de co-infección y recuentos de esporos de *Nosema* spp./abeja desde las regiones más cálidas (Cálido, Semiárido y Transición Chaco) a las regiones más frías (Centro y Sur de Santa Fe) del estudio.
- ✓ Se encontró una fuerte presencia de *N. apis* en regiones de clima subtropical.
- ✓ Este patrón de distribución inusual de *Nosema* spp. y el nivel de infección, pueden ser causados por una diversidad de factores, entre ellos se podrían citar prácticas apícolas, temperaturas medias de cada región, etc.
- ✓ No se halló una asociación entre el haplotipo de las abejas y la especie de *Nosema* spp.
- ✓ Alternativamente, un proceso de recambio en curso de *N. apis* a *N. ceranae* también puede dar lugar al patrón de distribución de las especies observado.

Capítulo IV: Identificación de factores de riesgo asociados a la presencia de *Nosema* spp. luego de la cosecha de miel*

*Pacini, A., Giacobino A., Molineri A, Bulacio Cagnolo N., Aignasse A., Zago L., Mira A., Izaguirre M., Schnittger L., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Pietronave H., Signorini M. 2016. Risk factors associated with the abundance of *Nosema* spp. in apiaries located in temperate and subtropical conditions after honey harvest. *Journal of Apicultural Research* 55: 4, 342–350.

Introducción

Muchos factores estresantes están actuando para debilitar la salud de las abejas. Uno de ellos es la Nosemosis, una enfermedad causada por dos especies de microsporidios (Phylum Microspora), *Nosema apis* y *Nosema ceranae* [240]. Ambos se encuentran comúnmente en abejas melíferas adultas (*Apis mellifera*) en todo el mundo y representan parásitos obligados del intestino de la abeja, lo que reduce la vida útil de su huésped [61].

La patología causada por *N. apis* se ha denominado Nosemosis tipo A. El parásito puede causar un daño tisular importante en el intestino, lo que reduce la supervivencia invernal en climas templados, la producción de miel y la eficacia de la polinización [241]. *N. ceranae* puede causar Nosemosis tipo C que provoca estrés nutricional y energético [71], supresión de la respuesta inmune del hospedador [69] y disminución de la supervivencia de las abejas a nivel individual [193, 242].

El rol que estos agentes tienen en las pérdidas de colmenas ha generado mucha controversia [6]. En varios países europeos se ha pensado que la rápida diseminación de *N. ceranae* está relacionada con un número creciente de muertes y baja producción de colmenas de abejas [61, 161, 243]. Diferentes informes han propuesto que los factores climáticos desempeñan un papel en el resultado de las infecciones por *N. ceranae* [5]. Las bajas temperaturas inhiben la germinación de *N. ceranae* más que la germinación de *N. apis* [64]. Varios estudios realizados en regiones con climas más fríos (Suecia, Alemania) mostraron un predominio de *N. apis*, pero en los países europeos con veranos calurosos e inviernos moderados *N. ceranae* fue la especie predominante [39]. Sin embargo, un reciente estudio canadiense sugiere que *N. ceranae* puede adaptarse mejor que *N. apis* en climas más fríos [209]. Aún queda por aclarar cómo las variaciones geográficas y estacionales pueden influir en la patogenicidad de *Nosema* spp.

En simultáneo, algunas prácticas apícolas pueden ser responsables de mantener las formas más virulentas de los patógenos, ya que contribuyen a su transmisión horizontal [244]. Entre las prácticas relacionadas con el desarrollo de la parasitosis, se ha documentado que algunas prácticas higiénicas, como el recambio de panales viejos, pueden reducir las cargas de esporos de *N. apis* [48], otra de las prácticas asociadas a bajas cargas de esporos de *Nosema* spp. es el recambio de reinas, las colmenas con

reinas jóvenes no logran desarrollar la parasitosis con tanta intensidad en relación a las colmenas con reinas más longevas [156].

Cada zona geográfica presenta una disponibilidad de recursos particular para las abejas dependiendo de sus condiciones ambientales [245]. La calidad y las fuentes de alimento para las abejas ha decrecido notablemente en gran parte del mundo [246]. Los cambios en el uso de la tierra son los que provocan la reducción de la diversidad de flores [247], promovidos por el avance tecnológico y los precios de mercado. Estas reducciones en los aportes nutricionales pueden incidir de manera directa en la sanidad de las colmenas.

En Argentina hay pocos estudios que hayan analizado el impacto de las infecciones por *Nosema* spp. sobre las abejas y su interacción con las condiciones ambientales. Con base en diferentes estudios observacionales en el sureste de Argentina, Sarlo [7] concluyó que la Nosemosis debida a la infección por *N. ceranae* produce una alta mortalidad y un desarrollo retrasado de las colonias de *A. mellifera*. Ese estudio estableció que las esporas de *N. ceranae* tienen una dinámica estacional en las colonias que se correlaciona negativamente con la temperatura. Otros estudios, también realizados en Argentina, no pudieron encontrar una relación entre el nivel de esporulación de *Nosema* spp. y los parámetros de fortaleza de la colmena [8,9]. La epidemiología de esta enfermedad parece ser compleja, y múltiples factores pueden estar involucrados simultáneamente. En este contexto, deben considerarse estrategias que permitan mitigar los efectos de esta patología. Los estudios epidemiológicos permiten identificar factores que pueden explicar los brotes de enfermedades y ofrecen información para sustentar científicamente las medidas de manejo apropiadas para controlar su efecto sobre la sanidad de las abejas [119].

Objetivo

Identificar los factores de riesgo asociados con colmenas con alto nivel de infección de *Nosema* en la etapa post-cosecha.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional transversal entre febrero y marzo de 2015 en las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa. El número de apiarios muestreados (n= 64) se calculó considerando una prevalencia estimada de *Nosema* spp. de 86,1% [8], para un

total de 5300 apiarios localizados en la zona bajo estudio, una confianza del 95% y un error en la estimación del 10%. Los apiarios se encontraban localizados en las cinco regiones agro-ecológicas descritas: Santa Fe Sur, Santa Fe Centro, Chaco Húmedo, Chaco de Transición y Chaco Semi-árido (Tabla 1). El número de apiarios muestreados dentro de cada región agro-ecológica fue determinado en función de la participación proporcional de cada estrato en el número total de apiarios existentes. De esta manera se tomaron muestras en 48 colmenas en la región Santa Fe Sur, 102 en Santa Fe Centro, 91 en Chaco Húmedo, 78 en Chaco de Transición y 66 en Chaco Semi-árido (Figura 1).

Tabla 1. Características generales de las regiones agro-ecológicas analizadas

Región Agro-ecológica	Temperatura media anual (°C)	Precipitación media anual (mm)	Usos de la tierra	Flujo de Néctar/Polen	Principal Vegetación circundante
Sur de Santa Fe	18	600-1100	Soja, maíz y trigo	Corto (menos de tres meses)	Monte y cultivo
Centro de Santa Fe	17-18	800-900	Tambos, animales de invernada en pasturas de alfalfa	Intermedio (tres–cuatro meses)	Monte y cultivo
Chaco Húmedo	23	> 1200	Granjas pequeñas ganadería, producción forestal o arrocería	Largo (entre 9 a 10 meses)	Monte y pastizal
Chaco de Transición	23-24	< 1000	Cultivo de cereales, oleaginosas algodón y ganadería	Largo (entre 9 a 10 meses)	Monte y pastizal
Chaco Semi-árido	23	550-800	Producción forestal	Largo (entre 9 a 10 meses)	Monte y pastizal

De cada apiario se seleccionaron el 10% de las colmenas del apiario o 6 colmenas como mínimo en aquellos apiarios que tenían hasta 60 abejas y determinó: recuento de esporos de *Nosema* spp., porcentaje de *Varroa* forética y parámetros que caracterizan la fortaleza de las colmenas (población de abejas, área con cría, con polen y con miel). En cada apiario se registró la temperatura y humedad ambiental obteniendo la información de las estaciones meteorológicas más cercanas.

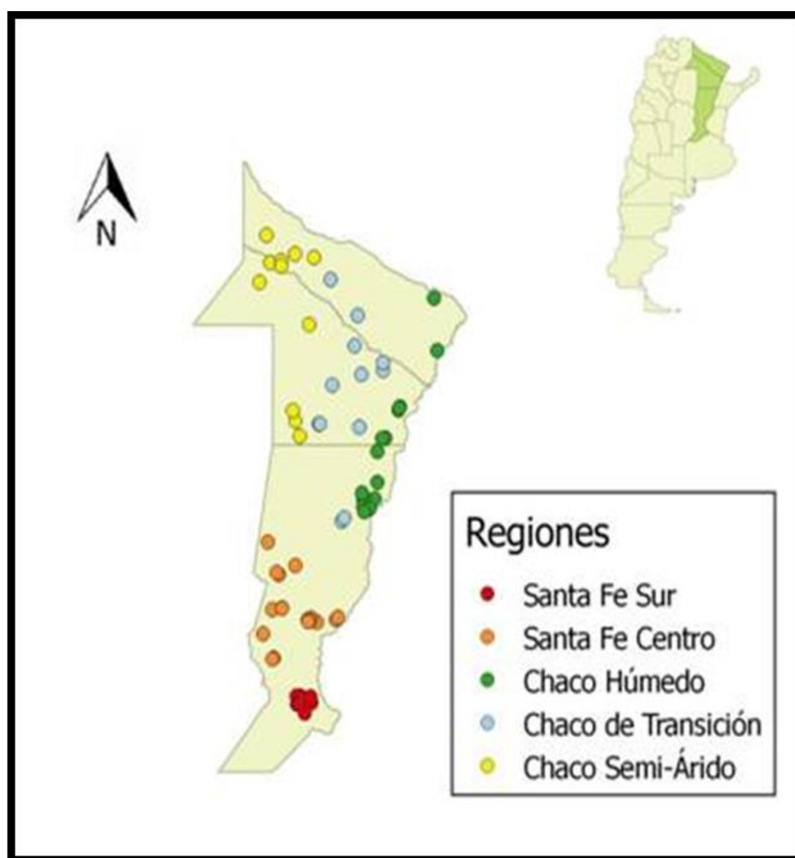


Figura 1. Apiarios distribuidos en las distintas regiones agro-ecológicas.

Porcentaje de parasitación en abejas adultas

Se tomó una muestra de aproximadamente 300 abejas nodrizas colectadas de dos o tres cuadros de cría diferentes y se colocaron en un frasco con agua y alcohol (1:1). En el laboratorio se agregó a cada frasco unas gotas de detergente. Posteriormente, los frascos se agitaron vigorosamente durante unos minutos, se vació el contenido sobre un tamiz que retuvo las abejas dejando pasar los ácaros que fueron recibidos en un paño blanco colocado debajo del tamiz. Se contabilizaron los ácaros, las abejas y se determinó el porcentaje de infestación o tasa de infestación de *Varroa forética* (VF) en abejas adultas [248, 249]. Se utilizaron resultados previos para sub-categorizar las colmenas en dos niveles de infestación, alto: >3% VF y bajo: ≤3% VF [250, 154].

*Recuento de esporas *Nosema* spp.*

De cada colmena se tomaron aproximadamente 100 abejas retornantes del vuelo directamente de la piquera que fueron recolectas en frascos plásticos conteniendo 60 ml de alcohol 96%.

Para realizar el recuento se maceraron 60 abdómenes de abejas seleccionadas aleatoriamente. El número de recuentos de esporos de *Nosema* spp./abeja se determinó mediante la observación directa empleando microscopio óptico y hemocitómetro. De cada muestra se contó el número de esporos contenidos en 80 cuadros del hemocitómetro (5 grupos de 16 cuadros) [110, 180].

Encuestas de manejo

Simultáneamente con el muestreo se aplicó a los productores apícolas una encuesta semi-estructurada (Anexo 2, 3, 4) para conocer aspectos de manejo del apiario. Se recopilaron datos relacionados con: número de colmenas, tipo de actividad, práctica de transhumancia, origen de reinas, suplementos alimenticios aplicados, tratamientos para Varroosis y Nosemosis y tipo de invernada realizada (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de variables derivadas de las encuestas que fueron evaluadas como potenciales factores de riesgo

	Factores/variables
Datos generales del apiario	Región: Santa Fe Norte, Centro, Chaco Húmedo, Chaco de transición, Chaco semi-árido
	Tamaño del apiario: número de colmenas por apiario
Prácticas de Manejo	Suplementación proteica: polen natural, polivitamínicos o torta de polen
	Alimentación c/ carbohidratos: Jarabe de sacarosa o maíz de alta fructosa
	Cuando aplica carbohidratos: Otoño o en cualquier momento del año
	Multiplicación de colmenas: Si o No (producción de núcleos)
	Frecuencia de recambio de reinas: Más de dos años- Dos años o menos
	Remplazo anual de Cuadros: cuadros nuevos por colmena/año
	Desinfección del material inerte post-cosecha: Si/No
	Ubicación del apiario: Sol directo-Arboles hojas perenes-Arboles hojas caducas
	Bloqueo de cámara: Jarabe 2:1- Jarabe 1:1- No bloquea

Uso de poncho: Si/No

Trashumancia: Si/No

Apiarios cercanos: Si/No

Vegetación circundante: Monte y pastizal- Monte y cultivo- Cultivo

Enfermedades

Varroa pre tratamiento: >3%- <3%

Nosema pre tratamiento: Si/No

Análisis de los datos

Se realizó la transformación del recuento de esporas de *Nosema* spp. a log del recuento de esporas (variable de respuesta), previo agregado de una constante de 1,5 a cada dato para poder realizar esta transformación en resultados donde hubo ausencia de esporas. Esta transformación se realizó para disminuir la gran variación encontrada en los datos de conteo de esporos de *Nosema* spp. Para identificar los factores asociados con el recuento de esporas de *Nosema* spp. se realizó un análisis en dos etapas empleando Modelos Lineales Generalizados Mixtos. Con base en la distribución de frecuencias de la variable de respuesta, se empleó una distribución Gamma con función de enlace logarítmico. Inicialmente se procedió a realizar un análisis univariante (apiario como efecto aleatorio) para seleccionar las variables explicativas potencialmente asociadas con el \log_{10} de la abundancia de esporos de *Nosema* spp./abeja. Se seleccionaron aquellas variables que tuvieron valores de $P \leq 0,15$ para ser ofrecidas al análisis multivariado. Sólo la variable explicativa con el mayor valor de P fue seleccionada para el modelo multivariado cuando dos de ellas explicaban resultados similares y estuvieron estadísticamente asociadas (evaluación de colinealidad). Se utilizó una estrategia de eliminación *backward* realizada en forma manual, seguida por la eliminación de una variable a la vez con el valor P más alto. Con cada variable eliminada del modelo, se verificó el coeficiente de las variables significativas y si dio lugar a un cambio de más del 20% en las estimaciones, la variable se mantuvo en el modelo para tener en cuenta su efecto de confusión [261]. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Análisis espacial

El método de detección de conglomerados espaciales [128] se utilizó para identificar y probar la importancia de grupos específicos para una distribución de población heterogénea. El conjunto de datos fue escaneado para detectar donde la abundancia de *Nosema* spp. fue significativamente menor o mayor de lo esperado por azar. Se calculó una prueba de razón de verosimilitud para cada posible área y el límite superior de exploración se estableció en el 50% de la población en riesgo. Se asumió, en este caso, que la abundancia de *Nosema* spp. seguía una distribución normal y se informó el grupo más probable junto con los grupos secundarios basados en los criterios del índice de Gini [252]. El modelo utiliza una función de probabilidad basada en la distribución normal, aunque la distribución verdadera del atributo continuo puede no ser normal. La inferencia estadística (valor *P*) es válida para cualquier distribución continua ya que la aleatorización no se realiza generando datos simulados a partir de la distribución normal, sino más bien, permutando las ubicaciones espacio-temporales y el atributo continuo (por ejemplo, abundancia de *Nosema* spp.). Todos los análisis se realizaron con el software SaTScan versión 9.2 (www.satscan.org). Finalmente, la distribución de los factores de riesgo dentro de los grupos detectados se analizó utilizando T-Student o Mann Whitney, según la distribución de variables.

Resultados

El tamaño medio de los apiarios fue $39,76 \pm 27,35$ colonias/apiario. Los apicultores que poseían estos colmenares tenían aproximadamente 11 años de experiencia en la actividad apícola ($11,76 \pm 7,69$ años). Durante los últimos tres años, la mortalidad promedio fue de $15,11 \pm 12,01\%$ colonias/año y la producción media de miel fue de $20,06 \pm 12,31$ kilogramos por colonia/año.

Las colonias tenían $8,53 \pm 1,59$ cuadros completamente cubiertos de abejas adultas, $3,75 \pm 2,00$ cuadros cubiertas de cría, $0,77 \pm 0,67$ y $2,75 \pm 1,51$ cuadros cubiertos de polen y miel, respectivamente. Se pudo observar una correlación significativa entre el Log_{10} de la abundancia de *Nosema* spp./abeja y el tamaño de las colonias ($n = 324$; $r = 0,173$; $P = 0,002$), el polen ($n = 319$; $r = -0,239$; $P < 0,001$), y la miel ($n = 319$; $r = -0,250$; $P < 0,001$). Sin embargo, los coeficientes de correlación fueron bajos, siendo el valor de *P* influenciado por el tamaño de la muestra.

La prevalencia de *Nosema* spp. en las colonias fue de 50,13% (181/361) (Tabla 3). Sin embargo, la prevalencia fue diferente entre las regiones: Santa Fe Sur presentó 23,8% de las muestras positivas, 38,7% Santa Fe Centro, 14,9% en Chaco Húmedo, 12,7% en Chaco de Transición y el 9,9% en Chaco Semi-árido. La abundancia media del \log_{10} de la abundancia de *Nosema*/abeja fue de $2,37 \pm 2,75$. Sur y Centro de Santa Fe presentaron la mayor abundancia con $4,99 \pm 1,84$ esporos de *Nosema*/abeja (Log_{10}) y $3,50 \pm 2,66$ esporos de *Nosema*/abeja (Log_{10}), respectivamente. Por otro lado, las regiones subtropicales mostraron niveles más bajos que las de Santa Fe: en Chaco Húmedo $1,14 \pm 2,50$ esporos de *Nosema*/abeja (Log_{10}), $1,54 \pm 2,29$ esporos de *Nosema*/abeja (Log_{10}) en Chaco de Transición y $1,13 \pm 2,75$ esporos de *Nosema*/abeja (Log_{10}) en Chaco Semi-árido.

Tabla 3. Características generales de las regiones agro-ecológicas analizadas.

Regiones agro-ecológicas	Tamaño del apiario (colmenas/apiario)	Actividad apícola (años)	Promedio de producción de	Promedio de mortalidad	Presencia de
Santa Fe Sur	26,88	10,92	18,65	15,87	91,5
Centro de Santa Fe	57,07	17,92	25,83	12,86	69,3
Chaco Húmedo	34,33	7,12	22,73	12,62	30,3
Chaco de Transición	34,11	11,41	14,71	16,77	29,5
Chaco Semi-árido	34,10	8,19	17,20	20,08	36,5

Análisis univariado

Nueve posibles variables explicativas fueron seleccionadas individualmente para ser incluidas en el modelo de regresión logística de efectos mixtos con apiario como efecto aleatorio (las variables elegidas tenían un valor de significancia $<0,15$). Las variables seleccionadas fueron: región agro-ecológica, tamaño del apiario, empleo de polivitamínico, multiplicación de colmenas, ubicación apiario, momento de alimentación, uso de "poncho" (bolsa de plástico que se utiliza en invierno para la protección del nido de cría), nivel de infestación de *Varroa* ($\leq 3\%$, $>3\%$), vegetación circundante (Tabla 4).

Tabla 4. Definición de las variables seleccionadas ($P < 0.15$) en el análisis univariado con potencial asociación con la abundancia de esporos de *Nosema* spp.

Definición de la variable	Nivel	Media	Desvío estándar	P-valor
Suplemento polivitamínico	Si	3,35	0,50	0,057
	No	2,25	0,28	
Suplemento de polen	No	1,70	0,32	0,733
	Torta	1,40	0,35	
	Polen natural	0,88	1,05	
Tamaño del apiario	<50 colmenas	1,33	0,24	0,133
	50 colmenas o más	2,29	0,67	
Momento de alimentación con carbohidratos	Otoño	1,38	1,97	<0,001
	Otro momento de año	3,63	2,47	
Recambio de reinas	Si	1,49	0,28	0,625
	No	1,73	0,43	
Frecuencia de recambio de reinas	Cada 1 o 2 años	1,70	0,43	0,714
	Cada más de dos años o no recambia	1,51	0,28	
BPH (Buenas Prácticas Higiénicas)	Malo	1,35	0,52	0,885
	Óptimo	1,53	0,41	
	Regular	1,67	0,34	
Apiarios cercanos	Si	1,64	0,29	0,944
	No	1,61	0,41	
Infestación con varroa	Menos de 3%	2,21	2,51	<0,001
	3% o más	3,04	2,49	
Multiplicación de colmenas	Si	2,73	2,53	0,025
	No	0,59	1,33	
Regiones agro-ecológicas	Santa Fe Sur	5,03	1,72	<0,001
	Centro de Santa Fe	3,64	2,45	
	Chaco Húmedo	1,47	2,01	
	Chaco de Transición	1,85	2,27	

	Chaco Semi-árido	1,47	2,08	
Ubicación del apiario	Sol directo	4,07	1,93	
	Bajo árboles de hojas perennes	1,81	2,19	<0,001
	Bajo árboles de hojas caducas	2,82	2,63	
Vegetación circundante	Monte y pastizal	1,90	2,26	
	Monte y cultivo	3,11	2,64	0,022
	Cultivo	3,10	2,52	
Uso de "poncho"	Si	3,11	2,55	
	No	2,23	2,43	0,127

La variable región agro-ecológica se asoció con la vegetación circundante ($P < 0,001$), por lo tanto, sólo la región se incluyó en el modelo final. Casi la mitad de las colmenas situadas en las regiones de Santa Fe, estaban delimitadas por monte y cultivos (62,5% en el Santa Fe Sur y 40% Santa Fe Centro). Por otra parte, 66,38% de las colmenas de las regiones de Chaco estaban circundadas por monte y pastizal (46,2%, 84,6% y 72,7% en Chaco Húmedo, Chaco de transición y Chaco Semi-árido, respectivamente).

Análisis multivariado

Los posibles factores de riesgo incluidos en el modelo estuvieron disponibles para 334 de las 361 colonias muestreadas (86,8%). El apiario como efecto aleatorio fue significativo ($P < 0,001$). El modelo multivariado final identificó dos variables asociadas con la abundancia de esporas de Nosema: Región agro-ecológica ($P = 0,015$) y la prevalencia de Varroa ($P = 0,034$) (Tabla 5).

Tabla 5. Modelo final de regresión logística multivariante (selección *backward*) para la abundancia de *Nosema* spp. en 361 colmenas de abejas distribuidas en 64 apiarios.

Efecto aleatorio	Estimador	95% CI		Valor P
Apiario	0,860	0,540-1,369		<0,001
Efectos fijos	Nivel	95% CI	Exp. β	Valor P
	Santa Fe Sur	0,07; 2,207	1,139	
	Centro de Santa Fe	-0,216; 1,55	0,667	
Región agro-ecológica	Chaco Húmedo	-0,732; 0,940	0,104	0,001
	Chaco de Transición	-0,809; -0,946	0,068	
	Chaco Semi-árido	-	-	
Infestación Varroa	Menos de 3% Varroa	-0,737; -0,180		
	Mayor o igual a 3% de Varroa	-	-0,459	0,037

Se observó una distribución geográfica particular, la mayor abundancia se registró en el sur (Santa Fe Sur; 3,50 log₁₀ Nosema esporas / abejas) y estos niveles se redujeron hacia las regiones del norte. Chaco de transición presentó los niveles más bajos (1,54 log₁₀ Nosema esporas / abeja). Además, las colonias con más de 3% de infestación de Varroa mostraron un aumento en los niveles de abundancia de Nosema (Figura 2). Las colmenas con niveles de infestación con varroa superior al 3% tuvieron aproximadamente recuentos de *Nosema* spp./abeja que fueron un orden de magnitud logarítmica mayor en comparación con las colmenas que presentaron infestaciones inferiores al umbral de daño económico.

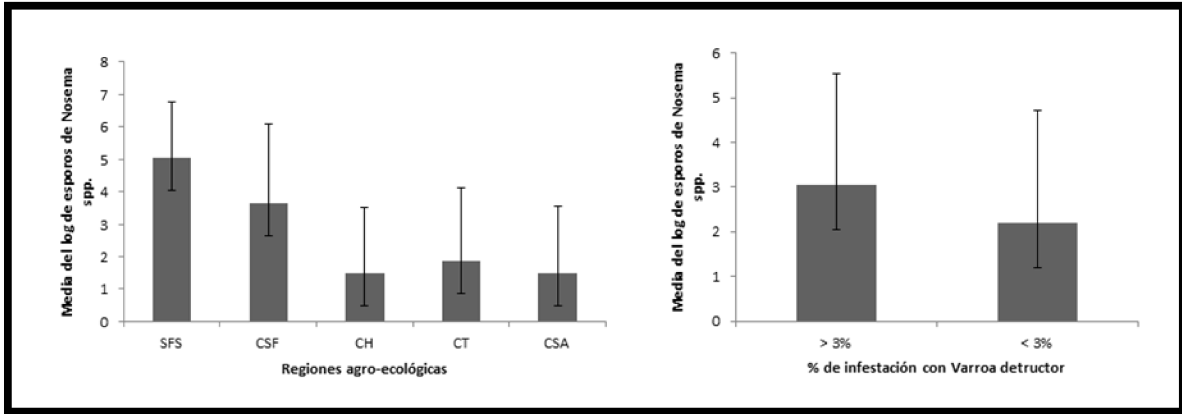


Figura 2. Variables del modelo final que resultaron significativas en asociación con el log₁₀ de esporos de *Nosema* spp. (efecto aleatorio= apiario; n = 361).

Las variables seleccionadas previamente que no fueron significativas en el modelo multivariado final se asociaron con los factores de riesgo identificados (Figura 3). Por ejemplo, el uso de "poncho" durante la temporada de invierno ($P < 0,001$), la suplementación con polivitamínicos ($P < 0,001$) y la multiplicación de colonias ($P < 0,001$) se asociaron con las regiones. Algunas prácticas de manejo, como el uso de poncho (62,5%) y la suplementación polivitamínica (62,5%) fueron utilizados con más frecuencia en la región Santa Fe Sur, pero no en regiones del Chaco (35,75% y 15,31%, respectivamente). Además, la prevalencia de *Varroa* se asoció con la ingesta de carbohidratos en las colmenas durante el otoño ($P = 0,030$), siendo que el 65% de las colmenas que tenían más de 3% de infestación con *Varroa* realizaban la alimentación en otro momento que no fuera el otoño, el 53% de las colmenas que tenían menos de 3% de infestación con *Varroa* fueron alimentadas durante el otoño.

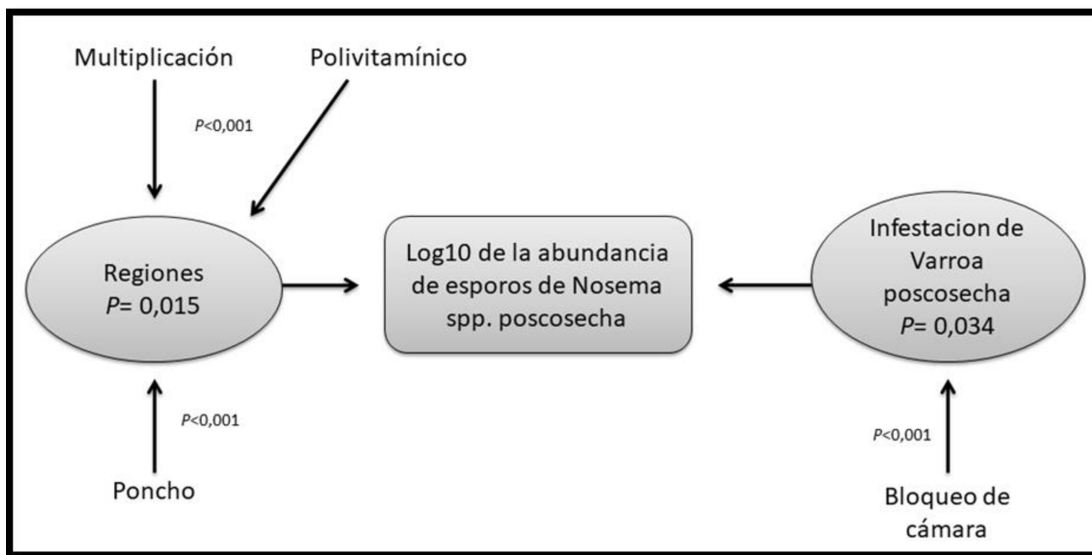


Figura 3. Asociación de variables obtenidas del análisis multivariado

Análisis espacial

Se detectaron dos *clusters* de alta y baja tasa de infestación por *Nosema* en todo el rango geográfico. Se identificó un *cluster* de alto valor de abundancia de esporos de *Nosema* spp./abeja con un total de 124 colonias y un grupo de bajo valor de abundancia con 180 colonias (57 colonias no se asociaron a ninguno de los dos *clusters*). El 77% de las colonias con >3% de infestación por *Varroa* previo al tratamiento de otoño, se asociaron significativamente con el *cluster* de alto valor de abundancia de *Nosema* spp. ($P < 0,001$). Además, las colmenas del Centro (61,9%) y del sur de Santa Fe (38,1%) fueron incluidas en el grupo de alto valor de abundancia, mientras que las colmenas de Chaco de Transición (31,1%) Semi-árido (28%) y Chaco Húmedo (40,9%) se incluyeron en el grupo de bajo valor de abundancia (Figura 3).

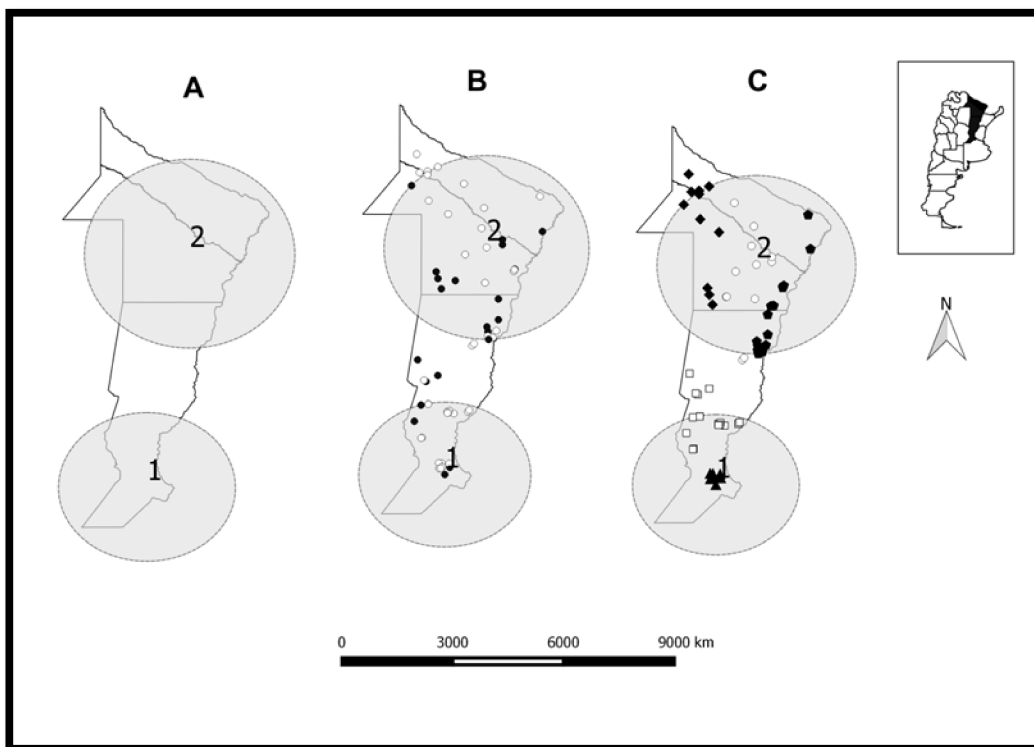


Figura 3. Distribución de los apiarios monitoreados por regiones (n=64). **A.** Distribución de los *cluster* de abundancia de esporos de *Nosema* spp.; altos valores de abundancia (1), bajos valores de abundancia (2). **B.** Asociación espacial entre los *cluster* de distribución de abundancia de *Nosema* spp. y el porcentaje de infestación con *V. destructor* (círculos negros: > 3% de infestación por colmena; círculos blancos: ≤ 3% de infestación por colmena). **C.** Asociación espacial entre la distribución de *cluster* de abundancia de *Nosema* spp. y las regiones (Referencias = Figura 1).

Discusión

Se determinaron los factores de riesgo que promueven la aparición de *Nosema* spp. en la etapa de post-cosecha de miel. La región donde se encuentran las colmenas y la prevalencia de alta infestación de *Varroa* se asociaron con la abundancia de *Nosema* en dicha etapa de estudio.

Efecto regional

Se observó un notable gradiente regional en la abundancia de esporas de *Nosema* spp., con recuentos altos en la región Santa Fe Sur, descendiendo en las regiones del norte, donde las temperaturas son más elevadas. El efecto provocado por la variable regional

puede tener implicancias con relación a cuestiones climáticas y también se pudo relacionar con el efecto del uso del suelo en las regiones analizadas.

Con relación al efecto climático, se pudo determinar que los resultados presentados en este estudio refuerzan la idea de que los factores climáticos pueden desempeñar un papel clave en la prevalencia de la Nosemosis [5,66]. En las regiones analizadas los climas preponderantes corresponden a templado para el Sur y Centro de Santa Fe y clima subtropical en el norte, las denominadas regiones Chaqueñas. Resultados similares se obtuvieron en Chile cuando se cotejaron zonas con altitudes similares [253, 254], dichos autores concluyeron que las zonas con mayor precipitación anual y menor temperatura media anual (clima templado) presentaron una mayor parasitación y aquellas localidades con mayores temperaturas y menores precipitaciones presentaron prevalencias más bajas. En un extenso trabajo realizado en distintas regiones de Europa, se determinó que el componente ambiental fue el único factor significativo que influyó en la prevalencia de distintas enfermedades de las abejas, entre ellas la presencia de *Nosema* spp. [66].

El efecto regional también se encuentra asociado con la vegetación circundante a la localización de los apiarios analizados. De este modo, se pudo determinar que los niveles más bajos de esporas se encontraban en apiarios con monte y pastizal circundándolos, mientras que las colmenas con altos niveles de esporulación de *Nosema* spp. se encontraban ubicadas en apiarios rodeados por cultivos (especialmente de soja y maíz). Actualmente la intensificación agrícola y la aplicación de productos para el control de malezas y plagas afectan las áreas de forraje de las abejas [131]. Alaux y colaboradores [147] han reportado la relación entre la nutrición y la inmunidad en las abejas, considerando que la exposición a una dieta polifloral mejora algunas funciones inmunes en comparación con las dietas monoflorales. Los mismos autores demostraron los efectos interactivos entre microsporidios y pesticidas, indicando que ambos factores debilitan la salud de las abejas [147]. Considerando que las regiones de climas templados presentan condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la parasitosis y a su vez existe un alto porcentaje de colmenas en ambientes rodeados por cultivo, donde es frecuente el uso de pesticidas que pueden afectar la inmunidad de las abejas, es razonable una mayor abundancia de esporos de *Nosema* spp. en dichas regiones.

Entre los apicultores, cuando existen restricciones en la disponibilidad de polen, es una práctica común alimentar sus colmenas con mezclas de aminoácidos y vitaminas con

jarabe de azúcar para que sea más palatable para las abejas, no solo para satisfacer los requerimientos de proteínas de la abeja, sino también para fortalecer la resistencia fisiológica a las enfermedades [116]. Esta práctica estuvo relacionada con los niveles de *Nosema* spp., siendo mayor la abundancia de esporos en las colmenas que fueron alimentadas con suplementos polivitamínicos. Los ensayos en laboratorio realizados en Argentina demostraron que abejas alimentadas con polen fresco [116] o compuesto amino-vitamina [255], desarrollan rápidamente la infección con *N. ceranae*. Este efecto puede deberse a la competencia que genera el parásito con la alimentación del hospedador una vez que se encuentra establecido. Se ha documentado en ensayos de laboratorio, que la especie *N. ceranae* provoca hambre en las abejas alimentadas con carbohidratos, de esta forma se produce un estrés energético, que conduce a una menor supervivencia de abejas expuestas al parásito [71]. Los mismos autores observaron que las abejas infectadas y alimentadas *ad libitum* tienen la misma supervivencia que las no infectadas. Lo anterior estaría indicando que la disponibilidad de alimento podría enmascarar la mortalidad causada por el estrés energético impuesto por el parásito. Existen resultados de distintos estudios que afirman que se vio aumentada la supervivencia en abejas alimentadas con pan de abeja en comparación con sustitutos de proteínas, a pesar del mayor desarrollo de parásitos [117, 118]. Según lo informado por Archer [255], la proteína confiere un beneficio de supervivencia en las abejas que padecen altos niveles de estrés y mejora su capacidad para enfrentar una respuesta al mismo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían reforzar la idea de un efecto beneficioso a largo plazo en las colmenas al alimentarlas con suplementos, ya que, aunque propician el desarrollo de la parasitosis aumentan la supervivencia de las colmenas infectadas. Invernizzi y colaboradores [243] han reportado que suplementar las colmenas en determinadas épocas del año puede reducir los niveles parasitarios de las colmenas.

Otras prácticas de la apicultura vinculadas a las regiones agro-ecológicas fueron el uso de "poncho" y la multiplicación de colmenas. Aquellos apiarios que utilizaban poncho presentaron mayores niveles de esporulación que los que no realizan dicha operación. Esta práctica es común en zonas frías y reduce el consumo de miel mediante el aislamiento del bolo invernal. El "poncho" anula el comportamiento natural del bolo mediante la compresión de las abejas que dan lugar a largos períodos de exposición y generan las condiciones óptimas de temperatura para el desarrollo de los parásitos [7]. Se pudo determinar que el uso del poncho estuvo más extendido en las regiones de clima

templado (Sur y Centro de Santa Fe). Sin embargo, dicha práctica podría ser una variable asociada en momentos claves del desarrollo de la parasitosis como es el caso de la salida del invierno o inicio de primavera, ya que durante el confinamiento de invierno las abejas se encuentran expuestas a periodos extensos de encierro, sin poder volar y generando un foco de infección elevado dentro de la colmena [157]. Con relación a la multiplicación, se determinó que dicha práctica asociada a las regiones agro-ecológicas, se presentaba en colmenas con mayor número de esporos de *Nosema* spp. Esto podría indicar que los apicultores que realizan dicha práctica podrían estar dispersando la parasitosis en nuevas colmenas.

Efecto de la infestación con Varroa

Un segundo factor de riesgo asociado con la abundancia de *Nosema* spp. fue el nivel de infestación de *Varroa*. Las colmenas con más de 3% de *Varroa* en las abejas tenían más abundancia de esporas de *Nosema* spp. A escala global, la mayoría de las colmenas manejadas de *A. mellifera* están infectadas por *V. destructor*, el cual es considerado una de las principales amenazas a la apicultura mundial [256]. Su interacción con otros posibles factores que generan por separado efectos sub-letales en las colmenas en conjunto pueden ser letales [185]. Muchos estudios informaron los efectos sinérgicos entre *N. ceranae* y *V. destructor* que podrían explicar las pérdidas de colonias observadas en Europa y EE.UU. [61, 160, 257, 258]. Por otro lado, Botias *et al.* [84] presentaron un trabajo donde determinaron que la infección por *Nosema* spp. puede afectar el comportamiento de las abejas y, en consecuencia, los tratamientos contra *Varroa* son menos eficaces en colonias afectadas por Nosemosis. Existen varias hipótesis que podrían explicar los efectos sinérgicos entre ambos patógenos. Por un lado, el aumento en la permeabilidad de la membrana peritrófica después de la infestación por *V. destructor* puede aumentar la susceptibilidad a la infección por *Nosema* spp. Por otro lado, cambios comportamentales por el aumento del estrés energético generado por la Nosemosis aumentarían la susceptibilidad a la infestación por *V. destructor*. Otra hipótesis posible, podría deberse al debilitamiento provocado por las infestaciones con *Varroa*, volviendo más inefectiva la vigilancia y la defensa de las colmenas siendo fácilmente “pilladas” por abejas provenientes de colmenas más fuertes [244]. Este movimiento de abejas entre colmenas puede propiciar la transmisión horizontal de patógenos, como podría ser el caso de la Nosemosis. La co-infección de ambos patógenos también puede estar dada por la

inmunosupresión y la disminución de la expresión de vitelogenina en las abejas [69, 259]. Estos efectos enumerados previamente dan cuenta de una asociación sinérgica entre ambas patologías.

Se determinó una fuerte asociación entre las colmenas con >3% de infestación con *Varroa* forética y las que recibieron jarabe de azúcar para realizar el bloqueo y los que lo realizan en otro momento que no sea otoño. Es probable que esta práctica, si no se realiza de manera correcta y en los momentos del año requeridos, propicie el aumento en el número de celdas de cría [260] y de este modo podría provocar un aumento de la reproducción de *Varroa*. El bloqueo de cámara, genera un efecto indirecto, ya que al aumentar los niveles de *Varroa* provocaría un aumento de los niveles de *Nosema* spp.

Análisis espacial

Los métodos para detección de *cluster* son las herramientas más comunes para evaluar patrones de distribución espacial no aleatorias [126]. Los factores de riesgo asociados con la abundancia de *Nosema* spp. del modelo final estuvieron relacionados con *clusters* de alta y baja tasa identificadas en el análisis espacial. Del mismo modo que se pudo determinar en el modelo un gradiente Norte a Sur en aumento con los recuentos de esporos de *Nosema* spp., se determinaron *clusters* de baja tasa en el Norte y de alta tasa en el Sur. Por otro lado, el modelo también presentó asociación con la parasitación con *Varroa*, los *clusters* de alta tasa estuvieron asociados a colmenas con más de 3% de *Varroa* y los de baja tasa se asociaron a colmenas con menos de 3 % de *Varroa*.

La heterogeneidad en las condiciones ambientales, la disponibilidad de los recursos nutricionales y las prácticas de manejo podrían explicar en cierta medida los resultados presentados. Este estudio se realizó en un momento del año cuando la infestación de *Varroa* era alta y podría haber afectado el desarrollo de la Nosemosis. Algunos estudios han sugerido que el efecto sinérgico entre *N. ceranae* y *V. destructor* puede ser la causa de las pérdidas observadas en distintas partes de Europa y Estados Unidos [61, 160, 261, 262]. En torno a este efecto, se ha documentado la inmunosupresión causada por *Varroa* [259, 263, 264], lo cual podría predisponer a la ocurrencia de otros patógenos, como es el caso de ambas especies de *Nosema* spp. Por otro lado, el efecto demostrado que presentan ambos patógenos (*N. ceranae* y *V. destructor*) reduciendo la expresión de la vitelogenina puede tener un efecto devastador en las colmenas [69]. Sin embargo, se

necesitan más estudios para dilucidar mejor el efecto de *Varroa* en presencia de *Nosema* spp.

¿Cuál es el patógeno que debemos controlar con mayor esmero para poder tener colmenas sanas? Considerando la virulencia y la asociación que puede tener *Varroa* en la ocurrencia de ésta como otras patologías (virus) y debido a que existen algunos productos para su control, sería apropiado concentrar esfuerzos en minimizar los efectos del ácaro sobre las abejas y de dicho modo se reducirían las cargas de los patógenos que se asocian de manera directa o indirecta.

Conclusiones

- ✓ Las regiones agro-ecológicas y la prevalencia de *Varroa* fueron los factores asociados con la abundancia de esporas de *Nosema* spp.
- ✓ La información proporcionada hasta el momento muestra que las condiciones ambientales y la disponibilidad de los recursos nutricionales juegan un papel fundamental en el desarrollo de esta parasitosis.
- ✓ La alta prevalencia de *Nosema* spp. en las colmenas con prevalencia de *Varroa* superior al 3% podrían estar relacionadas con la supresión inmune de estas colonias para ambos patógenos.
- ✓ Prácticas de manejo que reduzcan las cargas de *Varroa* podrían ayudar a disminuir las cargas de *Nosema* spp.

Capítulo V: Identificación de factores de riesgo asociados a la presencia de *Nosema* spp. en el ingreso a la invernada y al inicio de la primavera

Introducción

Argentina exporta alrededor del 95% de su producción nacional de miel y contribuye al 6% de la producción mundial de miel [1]. Sin embargo, al igual que en otras regiones, la producción se ve afectada por problemas de salud de las abejas [265].

Existen muchas pérdidas de colonias registradas en todo el mundo, especialmente en Europa y los Estados Unidos [99, 100, 164, 266, 267, 268, 270]. Recientemente, en América del Sur, se están realizando investigaciones enfocadas en las pérdidas de colmenas, con resultados similares a los reportados en Europa y Estados Unidos [214, 265, 270, 271, 272]. Diferentes patógenos (*Varroa destructor*, *Nosema* spp., Virus) y otros factores de estrés (la inanición y la exposición a pesticidas) han sido identificados como factores potencialmente responsables de la pérdida de colmenas de abejas [214, 246, 275, 26, 277, 278].

En este contexto, en el presente trabajo nos enfocamos en identificar los factores que pueden contribuir a la aparición de ciertas enfermedades, como es el caso de la Nosemosis. *A. mellifera* puede ser parasitada por dos especies de microsporidios, *N. apis* y *N. ceranae*. La aparición de estos microsporidios está ampliamente documentada en climas templados [7, 65], pero poco se sabe sobre su presencia en climas tropicales o subtropicales [5, 279]. Dado que *N. ceranae* se describió recientemente como un patógeno de *A. mellifera* [3], surge una gran controversia sobre el papel de este microsporidio en relación con las pérdidas de colmenas. Algunos autores sugieren que *N. ceranae* está desplazando a *N. apis* [6, 39, 59, 161]. En Argentina, *N. ceranae* fue considerado el único responsable de Nosemosis [211]. Sin embargo, investigaciones publicadas recientemente informaron la presencia de *N. apis* en algunos apiarios del país [279].

Ambas especies muestran variaciones temporales y regionales [202, 204], siendo documentado en regiones del centro de Santa Fe un patrón de distribución de la enfermedad con picos de mayor esporulación en los meses de finales de otoño y comienzo de la primavera [8,9]. Estos momentos suelen encontrarse relacionados a épocas de reducción en la disponibilidad de alimento y son momentos clave en la implementación de prácticas de manejo del apiario para el control de patógenos. Por tal motivo es esencial identificar los factores asociados con la presencia de *Nosema* spp. en dichos momentos y en distintas regiones, especialmente con relación a las variaciones ambientales que puede

darse y también a prácticas de manejo que realizan los apicultores en sus apiarios. A partir de lo anterior será posible diseñar estrategias tendientes al control de esta enfermedad en los colmenares ubicados en climas templados y subtropicales de nuestro país.

Objetivos

1. Identificar los factores de riesgo asociados con la aparición de Nosemosis en ambientes templados y subtropicales de Argentina en el otoño y al inicio de la temporada apícola (primavera).
2. Evaluar el impacto de la Nosemosis sobre la producción de miel y el estado de las colmenas.

Materiales y métodos

Diseño del estudio y tamaño de la muestra

En el presente trabajo se realizó un estudio observacional longitudinal en tres provincias de Argentina, Santa Fe, Chaco y Formosa. El estudio se llevó a cabo en dos momentos del año, teniendo en cuenta las altas cargas de *Nosema* spp. registradas durante ese período de tiempo. El primer momento de muestreo se determinó en otoño (entre abril y junio), mientras que el segundo momento fue fijado durante la primavera (entre septiembre y noviembre). Los apiarios muestreados se ubicaron en el norte y centro de Argentina (Figura 1, Capítulo 4). Se tomaron muestras de un total de 335 colonias de 56 apiarios (propiedad de diferentes apicultores), las colmenas muestreadas fueron las mismas que las del muestreo post-cosecha, pero el número de apiarios se redujo debido a no contar con la disponibilidad del inicio del trabajo. Basado en el período de flujo de néctar, el programa de manejo de la apicultura, la categorización de las regiones agro-ecológicas [132, 135] y las prácticas agrícolas [133, 134], se definieron cinco regiones: Santa Fe Sur; Santa Fe Centro; Chaco Húmedo; Chaco de Transición; y Chaco Semi-árido (Tabla 1, Capítulo 4).

El número de apiarios muestreados de cada región se determinó de acuerdo con el número de apiarios registrados para cada región bajo estudio. Los apicultores se eligieron al azar siguiendo procedimientos de aleatorización estratificada (números aleatorios computarizados) [224]. Dentro de cada apiario, se seleccionó al azar un mínimo de seis colmenas o el 10% del total de colmenas del apiario en caso de que existieran más de 60

colmenas en el apiario [195] para evaluar los niveles de esporulación de *Nosema* spp. (abundancia de *Nosema* spp.) y nivel de infestación de *V. destructor*.

Recopilación de datos

La recolección de datos se realizó dos veces durante todo el período de estudio (se tomaron muestras de las mismas colmenas en cada apiario en cada momento): en otoño y en primavera. Todas las muestras fueron tomadas en el mismo año (2015). Durante cada visita a los apiarios, registramos datos relativos a: medidas de la fortaleza de las colmenas (población adulta y área de cría, reservas de miel y polen), abundancia de *Nosema* spp. y niveles de infestación de *V. destructor*. Además, se aplicaron encuestas a los apicultores en cada momento de muestreo.

Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el muestreo post-cosecha (descrito en el Capítulo 4 de la presente tesis) para determinar variables asociadas a momentos previos a lo largo del año.

Porcentaje de parasitación en abejas adultas

Se tomó una muestra de aproximadamente 300 abejas nodrizas colectadas de dos o tres cuadros de cría diferentes y se colocaron en un frasco con agua y alcohol (1:1). En el laboratorio se agregó a cada frasco unas gotas de detergente. Posteriormente, los frascos se agitaron vigorosamente durante unos minutos, se vació el contenido sobre un tamiz que retuvo las abejas dejando pasar los ácaros que fueron recibidos en un paño blanco colocado debajo del tamiz. Se contabilizaron los ácaros, las abejas y se determinó el porcentaje de infestación o tasa de infestación de *Varroa forética* (VF) en abejas adultas [248, 249]. Clasificamos cada colonia en alto y bajo nivel de infestación de *Varroa* según un umbral crítico del 3% previo a un tratamiento con acaricida, 1% en otoño y 2% en primavera [250, 265, 280].

*Recuento de esporas *Nosema* spp.*

De cada colmena se tomaron aproximadamente 100 abejas retornantes del vuelo directamente de la piquera que fueron recolectas en frascos plásticos conteniendo 60 ml de alcohol 96%.

Para realizar el recuento se maceraron 60 abdómenes de abejas seleccionadas aleatoriamente. El número de recuentos de esporos de *Nosema* spp./abeja se determinó mediante la observación directa empleando microscopio óptico y hemocitómetro. De cada muestra se contó el número de esporos contenidos en 80 cuadros del hemocitómetro (5 grupos de 16 cuadros) [110, 180].

Determinación de especies de Nosema.

El ADN genómico se aisló de las muestras de recuento de esporas de *Nosema* spp. obtenidas en el monitoreo de otoño, de 51 apiarios utilizando el Mini Kit DNeasy Plant (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR específica de la especie se llevó a cabo como se describe en Chen [49].

Encuestas

En cada visita a los apiarios, las posibles variables explicativas del manejo se obtuvieron de encuestas respondidas por los productores apícolas. Las mismas recopilaron información sobre: ubicación geográfica, número de colonias y prácticas de manejo comúnmente realizadas (dietas con carbohidratos y proteínas, ubicación, multiplicación, transhumancia, producción de miel, etc.) (Anexo 2, 3 y 4).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de correlación de Spearman, entre las variables de fortaleza (número de abejas adultas, número de celdas de cría, miel y polen / colmena), la producción de miel y los recuentos de esporos de *Nosema* spp. en los distintos momentos de año para determinar la incidencia de la parasitosis en las colmenas muestreadas.

Para identificar factores asociados a la carga de esporos de *Nosema* spp. durante el período bajo estudio, se procedió a realizar un análisis en dos etapas. Inicialmente se realizó un análisis univariado utilizando Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMM - con apiario como efecto aleatorio) para seleccionar variables explicativas potencialmente asociadas con la abundancia de esporos de *Nosema* spp. en cada momento de estudio (otoño y primavera). La distribución de frecuencia de la variable de resultado (abundancia de *Nosema* spp.) presentó una desviación hacia la derecha y algunas muestras tuvieron cero esporos de *Nosema* spp./abejas. Por esa razón, se agregó un valor constante de 1000 a todas las muestras y se asumió que la distribución de frecuencia de esta variable

seguía una distribución Gamma que utiliza funciones de enlace logarítmico. Las variables con un valor de $P \leq 0,15$ se seleccionaron para un análisis multivariado posterior. La variable explicativa con el valor P más bajo se seleccionó para el modelo multivariado cuando dos de ellos explicaron resultados similares y se asociaron estadísticamente (evaluación de colinealidad) [120].

El análisis multivariado se realizó utilizando un GLMM (con el apiario como efecto aleatorio) para evaluar el efecto de las variables explicativas seleccionadas sobre la abundancia de esporos de *Nosema* spp. en cada momento de estudio. Se asumió que la variable de respuesta seguía una distribución Gamma con función de enlace logarítmico. Para reducir las variables dentro del modelo se siguió una estrategia de eliminación *backward* realizada en forma manual, seguida por la eliminación de una variable a la vez con el valor P más alto. Con cada variable eliminada del modelo, se verificó el coeficiente de las variables significativas y si dio lugar a un cambio de más del 20% en las estimaciones, la variable se mantuvo en el modelo para tener en cuenta su efecto de confusión [251]. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat [228]. (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Análisis espacial

El método de detección de conglomerados espaciales [128] se utilizó para identificar y probar la importancia de grupos específicos para una distribución de población heterogénea. El conjunto de datos fue escaneado para detectar áreas donde la abundancia de *Nosema* spp. fue significativamente menor o mayor de lo esperado por azar. Se calculó una prueba de razón de verosimilitud para cada posible área y el límite superior de exploración se estableció en el 50% de la población en riesgo. Se asumió, en este caso, que la abundancia de *Nosema* spp. seguía una distribución normal y se informó el grupo más probable junto con los grupos secundarios basados en los criterios del índice de Gini [252]. El modelo utiliza una función de probabilidad basada en la distribución normal, aunque la distribución verdadera del atributo continuo puede no ser normal. La inferencia estadística (valor P) fue considerada válida para cualquier distribución continua. La razón de esto es que la aleatorización no se realiza generando datos simulados a partir de la distribución normal, sino más bien, permutando las ubicaciones espacio-temporales y el atributo continuo (por ejemplo, abundancia de *Nosema* spp.). Todos los análisis se realizaron con el software SaTScan versión 9.2 [281]. Finalmente, la distribución de los

factores de riesgo dentro de los grupos espaciales detectados se analizó utilizando T-Student o Mann Whitney, según la distribución de variables.

Resultados

Fortaleza, producción y enfermedades

El promedio más alto de abejas adultas, cría y polen por colmena en el inicio de la invernada (otoño) fue de 18.803 ± 3.508 , 26.456 ± 14.147 y 5.486 ± 4.719 , respectivamente. En este momento, el Centro de Santa Fe era la región con más abejas adultas por colmena, la región con más celdas de cría fue el Santa Fe Sur y Chaco de Transición fue la región con más celdas de polen por colmena. El momento con el promedio máximo de celdas con miel por colmena se registró en Chaco de Transición en otoño con 22.417 ± 12.440 celdas de miel (Figura 2).

Al buscar asociaciones entre las variables de fortaleza y los recuentos de esporos de *Nosema* spp. se encontraron ciertas asociaciones, para el caso del recuento de esporos en otoño, se asoció con el número de celdas de cría en post-cosecha ($P < 0,001$; $r^2 = -0,24$), número de celdas con polen en post-cosecha ($P = 0,048$; $r^2 = -0,119$); número de celdas con miel en otoño ($P < 0,001$; $r^2 = -0,23$) y número de celdas con polen en otoño ($P < 0,001$; $r^2 = -0,202$). El recuento de esporas para la primavera se asoció con las celdas con polen en post-cosecha ($P < 0,001$; $r^2 = -0,205$), las celdas de cría en otoño ($P = 0,002$; $r^2 = -0,201$), las celdas con polen en otoño ($P < 0,001$; $r^2 = -0,214$), las celdas con abejas ($P < 0,001$; $r^2 = -0,310$), cría ($P = 0,021$, $r^2 = -0,160$), miel ($P < 0,001$; $r^2 = -0,338$) y polen ($P = 0,016$; $r^2 = -0,170$) en primavera. Cabe aclarar que los resultados indican asociaciones, pero los r^2 son demasiado bajos para poder asociar dichas variables.

Por otro lado, se analizó la relación entre los niveles de *Nosema* spp. en cada momento y la producción de miel al finalizar el año productivo en estudio (campaña 2015/16). Los resultados indicaron que no existió asociación entre los niveles de *Nosema* spp. post-cosecha ($P = 0,802$), otoño ($P = 0,076$) y primavera ($P = 0,534$) y la producción de miel en el período de estudio.

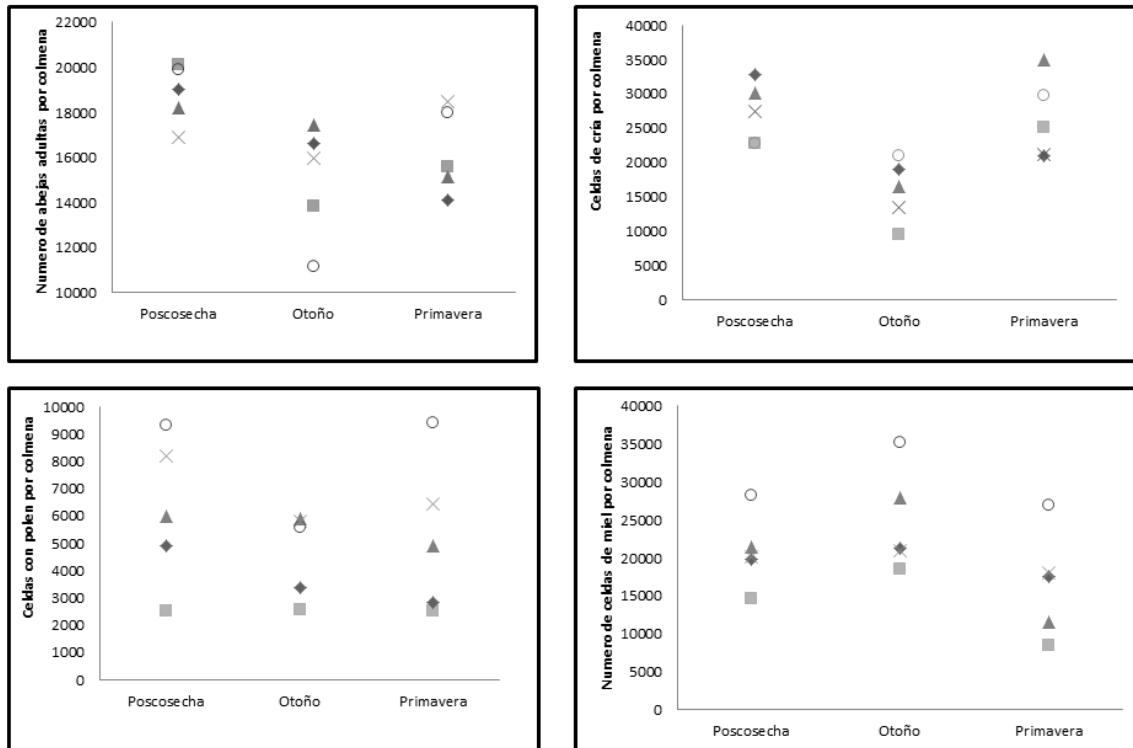


Figura 2. Número de cuadros con abeja (A), celdas de cría (B), celdas con polen (C) y celdas de miel (D) por colmena, en los distintos momentos de muestreo en cada región agroecológica (rombo = Santa Fe Sur; cuadrado gris= Santa Fe Centro; triangulo blanco= Chaco Húmedo; circulo blanco = Chaco Transición; cruz= Chaco Semi-árido).

Con respecto a la presencia de patógenos en las colmenas, la abundancia de *Nosema* spp. más alta se observó en la primavera con $702.145 \pm 2.365.566$ esporas/abejas. En dicho momento, Chaco Húmedo mostró el valor más alto de abundancia de esporos de *Nosema* spp. ($1.811.911 \pm 4.629.927$ esporas / abeja) (Figura 3) seguidos por el Centro y Sur de Santa Fe ($673.228 \pm 1.119.670$ esporos / abeja). La región de Chaco de Transición mostró los niveles más bajos en este momento (33.826 ± 89.620). Durante la postcosecha, la región Santa Fe Sur presentó los niveles más altos de parasitación ($993.482 \pm 1.572.635$ esporos / abeja) y el Chaco Húmedo presentó los niveles más bajos (47.193 ± 263.546 esporos / abeja). Para el otoño, la región Chaco Semi-árido fue la que presentó mayores niveles ($1.389.019 \pm 4.491.399$ esporos / abeja) y nuevamente Chaco Húmedo presentó los niveles más bajos (67.025 ± 206.846 esporos / abeja). Los resultados del análisis de especies de *Nosema* spp. indicaron que un 93% de las muestras analizadas

fueron positivas para *N. ceranae*, mientras que un 7% presentó co-infección. Las muestras que indicaron co-infección se ubicaban en un apiario de la región Centro de Santa Fe.

Como era de esperar, el nivel de infestación de *Varroa* fue más elevado en el muestreo post-cosecha ($7,13 \pm 8,71\%$), siendo Centro de Santa Fe la región que registró el nivel máximo de infestación ($10,31 \pm 11,58\%$), siendo el Chaco Semi-árido la región con menor porcentaje de infestación ($3,01 \pm 2,79\%$). En el otoño, los niveles de *Varroa* se redujeron considerablemente, debido a la aplicación de un tratamiento acaricida en la mayoría de las colmenas analizadas (80%). Las colmenas no tratadas pertenecían únicamente a las regiones de Chaco y en dicho momento la región de Chaco Húmedo presentó los porcentajes más elevados de infestación ($3,10 \pm 5,20\%$), siendo el Centro de Santa Fe, la región con los niveles más bajos de parasitación ($0,81 \pm 2,69\%$). Los datos en la primavera coinciden con lo reportado en el otoño, siendo el Chaco Húmedo la región con mayor infestación por *Varroa* ($2,26 \pm 2,73\%$) y el Centro de Santa Fe la región con menos ($0,53 \pm 1,35\%$).

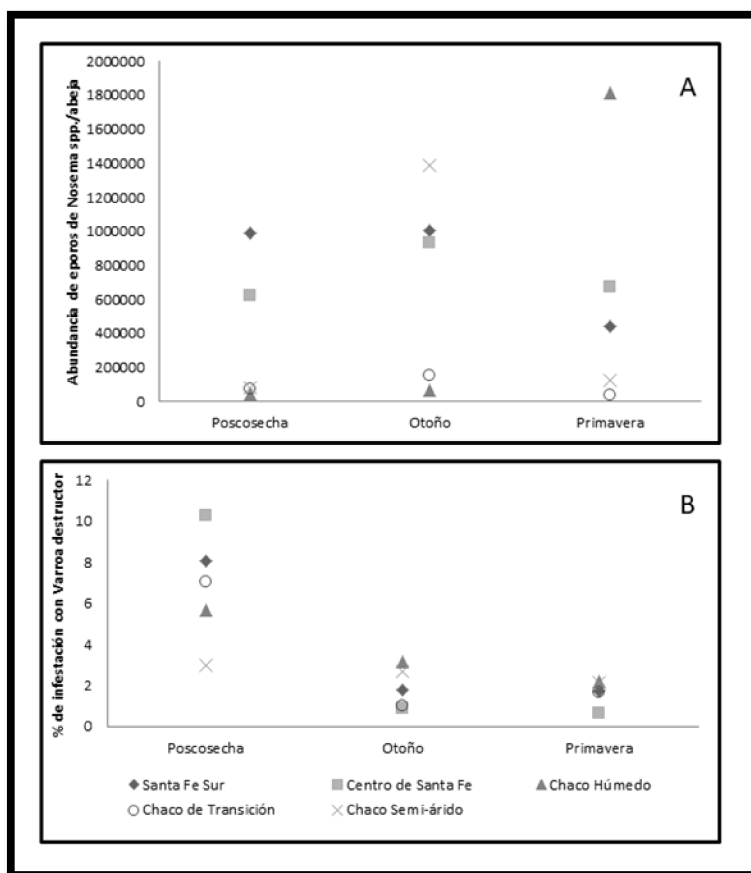


Figura 3. Abundancia de esporos de *Nosema* spp./abeja (A) y % de infestación con *Varroa* destructor (B) en las regiones bajo estudio en los distintos momentos de muestreo.

*Factores asociados a abundancia de *Nosema* spp. en otoño.*

Inicialmente, se analizaron dieciocho variables para encontrar una asociación con la abundancia de *Nosema* spp. en otoño (Tabla 2). Se seleccionaron siete posibles variables explicativas para ser incluidas en el GLMM: suministro polivitamínico ($P= 0,069$), reemplazo de reina ($P= 0,121$), multiplicación ($P= 0,030$), ubicación del apiario ($P= 0,009$), vegetación circundante ($P= 0,005$), abundancia de *Nosema* spp. post-cosecha ($P= 0,043$) y nivel de infestación de *Varroa* en otoño ($P= 0,003$). Las asociaciones entre las variables indicaron lo siguiente: aquellos productores que indicaron que utilizaban polivitamínicos en sus colmenas, presentaron mayores niveles de esporos de *Nosema* spp. que los que no utilizaban. Los que indicaron que realizaban frecuentes recambios de reinas tenían menor número de esporos que los que no realizaban dicha práctica. Los que multiplican sus

colmenas presentaron niveles superiores de *Nosema* spp. en comparación con aquellos que no lo realizaban. Las colmenas que se encontraban ubicadas bajo sol directo presentaban más esporos de *Nosema* spp. que las que se encontraban bajo árboles de hojas caducas y a su vez estas últimas más que las que se encontraban bajo árboles de hojas perennes. Los apiarios circundados por monte y pastizal presentaban menos esporos de *Nosema* spp. que los que estaban rodeados por monte y cultivo y menos que los que estaban rodeados por cultivo. Las colmenas que presentaron menos de 1% de *Varroa* en el otoño presentaron mayores niveles de esporos de *Nosema* spp. que las que tenían más de 1% de infestación con *Varroa* en el otoño. Las colmenas que tenían más esporos de *Nosema* spp. post-cosecha presentaron más *Nosema* spp. en otoño.

Tabla 2. Definición de las variables explicativas seleccionadas ($P < 0,015$) para el análisis univariado con potencial asociación con la abundancia de *Nosema* spp. en otoño y primavera.

Variable	Nivel	Abundancia de <i>Nosema</i> spp. en otoño		Abundancia de <i>Nosema</i> spp. en primavera	
		Media \pm DS	Valor <i>P</i>	Media	Valor <i>P</i>
Región agro-ecológica	Santa Fe Sur	945076 \pm 648498	0,21	307257 \pm 231740	0,001
	Centro de Santa Fe	937540 \pm 414450		228466 \pm 111287	
	Chaco Húmedo	68623 \pm 458255		241740 \pm 131354	
	Chaco de Transición	154181 \pm 514571		16559 \pm 11693	
	Chaco Semi-árido	1571661 \pm 570257		21847 \pm 15428	
Tamaño del apiario	Menos de 50 colmenas	48927 \pm 22038	0,543	75865 \pm 26160	0,008
	Igual o más de 50 colmenas	78834 \pm 21084		482820 \pm 290436	
Suplemento de polen	No	55266 \pm 24222	0,867	63100 \pm 23938	0,034
	Torta de polen	53864 \pm 30952		312850 \pm 23938	
	Polen Natural	225166 \pm 591694		51833 \pm 112230	
Suplemento polivitamínico	No	37546 \pm 14462	0,069	100803 \pm 36888	0,553
	Si	154878 \pm 104619		156094 \pm 99704	
Multiplicación	No	7456 \pm 9517	0,102	23542 \pm 26328	0,144
	Si	65216 \pm 22654		129347 \pm 41203	
Recambio de reinas	No	122466 \pm 73979	0,121	113190 \pm 61143	0,991
	Si	39550 \pm 16003		114052 \pm 43745	
Frecuencia de recambio	Cada 1 o 2 años	43.748 \pm 24871	0,584	43.511 \pm 21.112	0,013
	Cada más de dos años o no se hace	64.658 \pm 27.724		200.699 \pm 74931	
BPH (Buenas practicas higiénicas)	Óptimo	55807 \pm 33940	0,660	370440 \pm 180912	0,007
	Malo	28090 \pm 24490		75357 \pm 30559	
	Regular	68850 \pm 33940		30514 \pm 22627	
Ubicación del apiario	Bajo árboles de hojas perennes	29858 \pm 13983	0,009	34970 \pm 14586	0,001
	Bajo árboles de hojas caducas	48700 \pm 25267		245102 \pm 109837	
	Sol directo	534631 \pm 433809		441245 \pm 299547	

Vegetación circundante	Monte y pastizal	23579 ± 10933	0,035	39366 ± 16080	0,003
	Monte y cultivo	56971 ± 29954		193738 ± 92002	
	Cultivo	583151 ± 497919		480811 ± 346752	
Apiarios cercanos	No	65691 ± 40453	0,825	51094 ± 27751	0,069
	Si	55706 ± 23313		170047 ± 63687	
Infestación con Varroa post-cosecha	Menos de 3% de infestación	71795 ± 27205	0,160	87852 ± 29813	0,019
	Igual o más de 3% infestación	52351 ± 19228		148048 ± 48018	
Infestación con Varroa otoño	Menos de 1% infestación	73181 ± 25943	0,003	162829 ± 52282	0,008
	Igual o más de 1% infestación	27551 ± 11333		64022 ± 24592	
Abundancia de <i>Nosema</i> spp. post-cosecha	-	-	0,043	-	0,486
Abundancia de <i>Nosema</i> spp. otoño	-	-	-	-	0,037
Infestación con Varroa primavera	Menos de 1% infestación	-	-	117812 ± 37605	0,740
	Igual o más de 1% infestación	-		107650 ± 39620	

Después del análisis *backward*, el modelo final mostró dos variables asociadas significativamente con la abundancia de *Nosema* spp. en otoño (Tabla 3): ubicación del apiario ($P= 0,002$) y nivel de infestación de *Varroa* en otoño ($P= 0,029$). Los apiarios totalmente expuestos al sol tuvieron la mayor abundancia de *Nosema* spp. (534.631 ± 433.809 esporas / abejas). Las colonias con $>1\%$ del nivel de infestación de *Varroa* en otoño tuvieron menos abundancia de *Nosema* spp. (27.551 ± 11.333 esporas / abeja) que las colmenas con $<1\%$ de nivel de infestación de *Varroa* (73.181 ± 25.943 esporas / abeja). El efecto aleatorio del apiario fue significativo ($P < 0,001$).

Tabla 3. Modelo Lineal Generalizado Mixto (selección *backward*) para la abundancia de *Nosema* spp. en 335 colmenas en otoño.

Efecto aleatorio	Estimador	95% IC	Valor P
Apiario	1,97	1,65 - 2,36	<0,001
Efectos fijos	F	gl	Valor P
Suplemento polivitamínico	0,05	1	0,820
Multiplicación	0,02	1	0,880
Recambio de reinas	1,09	1	0,290
Ubicación del apiario	6,61	2	0,002
Vegetación circundante	2,09	2	0,127
Infestación con <i>Varroa</i> poscosecha	4,35	1	0,029
Abundancia de esporos de <i>Nosema</i> spp. post-cosecha	1,46	1	0,239

Referencias: F= parámetro estimado, 95% IC= intervalo de confianza 95%, gl= grados de libertad

Algunas de las variables seleccionadas previamente que no fueron significativas en el modelo multivariado final se asociaron con los factores de riesgo identificados. Por un lado, los niveles de infestación con *Varroa* en otoño se asociaron a la multiplicación de colmenas ($P= 0,009$), ya que el 82% de los apicultores que no multiplicaban sus colmenas tenían más de 1% de niveles de infestación en otoño, mientras que el 75% de los que sí multiplicaban tenían menos de 1% de infestación en esa estación del año/temporada. La variable ubicación del apiario se relacionó con el recambio de reinas ($P= 0,047$), dado que el 61% de los apicultores que no cambiaban reinas

se encontraban bajo árboles de hojas perennes y casi un 50% de los que recambiaban estaban ubicados bajo árboles de hojas caducas. Por otro lado, la vegetación circundante estuvo asociada a la ubicación del apiario ($P= 0,003$), ya que el 50% de los apiarios que se ubicaban bajo sol directo se encontraban rodeados por cultivos, el 60% de los que se encontraban bajo arboles de hojas caducas estaban rodeados por monte y pastizal y casi el 70% de los que se encontraban bajo arboles de hojas perennes estaban circundados por monte y pastizal. Por último, la ubicación del apiario también estuvo asociada los niveles de *Nosema* spp. en post-cosecha ($P< 0,001$), siendo los apiarios ubicados bajo el sol directo los que presentaban mayores recuentos de esporos de *Nosema* spp. (Figura 4).

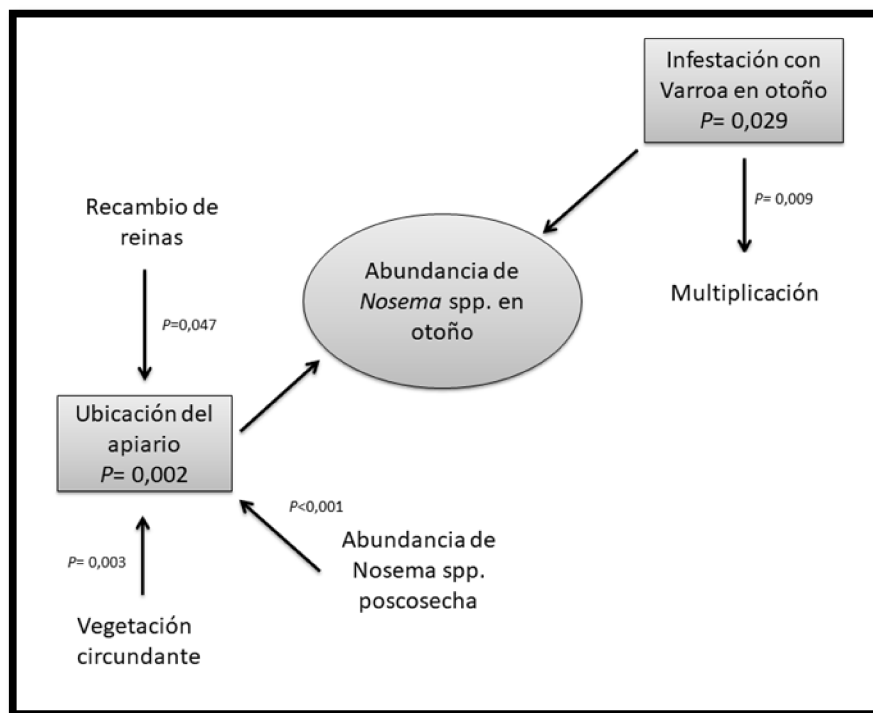


Figura 4. Asociación de variables obtenidas del análisis multivariado

Factores asociados a la abundancia de Nosema spp. en primavera

Luego del análisis univariado, se seleccionaron once posibles variables explicativas para ser incluidas en el GLMM: región agro-ecológica ($P= 0,001$), tamaño del apiario ($P= 0,008$), suministro de polen ($P= 0,034$), buenas prácticas de higiene (BPH) ($P= 0,007$), ubicación del apiario ($P= 0,001$), presencia de apiarios vecinos ($P= 0,069$), abundancia de *Nosema* spp. en otoño ($P= 0,037$), nivel de infestación de Varroa post-cosecha ($P= 0,019$) y nivel de infestación de Varroa en otoño ($P= 0,008$) (Tabla 2). La región Santa Fe Sur presentó los mayores recuentos de esporos de *Nosema* spp. con relación al resto de las regiones. Los apiarios que estaban constituidos por más de 50 colmenas presentaban más esporos de *Nosema* spp. que los apiarios más pequeños. Aquellos apicultores que indicaron suplementar con tortas de polen

tenían más recuento de esporos de *Nosema* spp. que los que no suplementaban, y a su vez estos últimos presentaban mayor infección que los que suplementaban con polen natural. Nuevamente la multiplicación de colmenas fue una variable asociada a las cargas de *Nosema* spp., siendo los que multiplicaban los que más esporos tenían. Aquellos apicultores que indicaron que realizaban recambio de reinas cada uno o dos años tenían menos esporos de *Nosema* spp. que los que lo hacían menos frecuentemente o no lo hacían. Los que realizaban prácticas higiénicas de manera óptima tenían más *Nosema* spp. que no lo hacían. La ubicación del apiario nuevamente dio resultados similares a los presentados en el otoño, siendo las colmenas que estaban ubicadas bajo sol directo las que presentaron mayores niveles de *Nosema* spp., seguidas por las que se ubicaban bajo árboles de hojas caducas y por último las ubicadas bajo árboles de hojas perennes. Otra de las variables que se presentó con la misma relación que en el otoño fue la vegetación circundante. Por otro lado, las colmenas que se encontraban cercanas a otros apiarios presentaban mayor recuento de esporos que las que no tenían apiarios cerca. Las colmenas que presentaban más de 3% de infestación con *Varroa* en post-cosecha tenían mayores cargas de *Nosema* spp. en este momento. Las colmenas que tenían menos de 1% de *Varroa* en el otoño presentaron mayores cargas de *Nosema* spp. Por último, las colmenas con más *Nosema* en otoño, presentaban más *Nosema* spp. en primavera.

Después de un análisis *backward*, el modelo final incluyó nueve variables (Tabla 4). Tres variables se asociaron significativamente con la abundancia de *Nosema* spp. en primavera: región agro-ecológica ($P= 0,050$), nivel de infestación de *Varroa* post-cosecha ($P= 0,016$) y nivel de infestación de *Varroa* en otoño ($P= 0,019$). El resto de las variables se mantuvieron en el modelo final porque se encontraban interactuando con el resto de las variables y el efecto al sacarlas modificaba en un 20% los coeficientes de las variables que permanecían en el modelo. El efecto aleatorio del apiario fue significativo ($P < 0,001$).

Los apiarios ubicados en Santa Fe Sur tuvieron la mayor abundancia de *Nosema* spp. (307.257 ± 231.740 esporos/abeja) al compararlos con las restantes regiones, las regiones de Santa Fe y Chaco Húmedo presentaron los niveles más altos de *Nosema* spp. en comparación con las regiones de Chaco de Transición y Semi-árido ($P= 0,050$). Las colonias con $>3\%$ del nivel de infestación de *Varroa* en post-cosecha tuvieron 148.048 ± 48.018 esporos/abeja de *Nosema* spp. en la primavera, mientras que las colonias con $<3\%$ del nivel de infestación de *Varroa* en post-cosecha presentaron recuentos de 87.852 ± 29.813 esporos/abeja de *Nosema* spp. en primavera. Las colonias con $>1\%$ del nivel de infestación de *Varroa* en otoño tuvieron una abundancia de *Nosema* spp. más baja (64.022 ± 24.592 esporos/abeja) que las colonias con $<1\%$ del nivel de infestación de *Varroa* en otoño (162.829 ± 52.282 esporos/abeja).

Tabla 4. Modelo Lineal Generalizado Mixto (selección *backward*) para la abundancia de *Nosema* spp. en 256 colmenas en primavera.

Efecto aleatorio	Estimador	95% CI	Valor P
Apiario	2,10	1,72 - 2,55	<0,001
Efectos Fijos	F	gl	Valor P
Región agro-ecológica	2,33	4	0,050
Tamaño del apiario	0,46	1	0,490
Suplementación con polen	0,27	2	0,750
BPH (Buenas prácticas higiénicas)	0,84	2	0,430
Ubicación del apiario	1,19	2	0,300
Apiarios cercanos	0,01	1	0,920
Infestación con <i>Varroa</i> post-cosecha	5,86	1	0,016
Infestación con <i>Varroa</i> otoño	5,15	1	0,019
Abundancia de <i>Nosema</i> spp. otoño	3,10	1	0,070

Referencias: gl= grados de libertad, F= parámetro estimado.

Solo la variable tamaño del apiario se asoció con la infestación de *Varroa* en el otoño ($P= 0,024$), siendo que el 93% de los apiarios que tenían más de 50 colmenas, presentaban menos de 1% de infestación con *Varroa* (Figura 5).

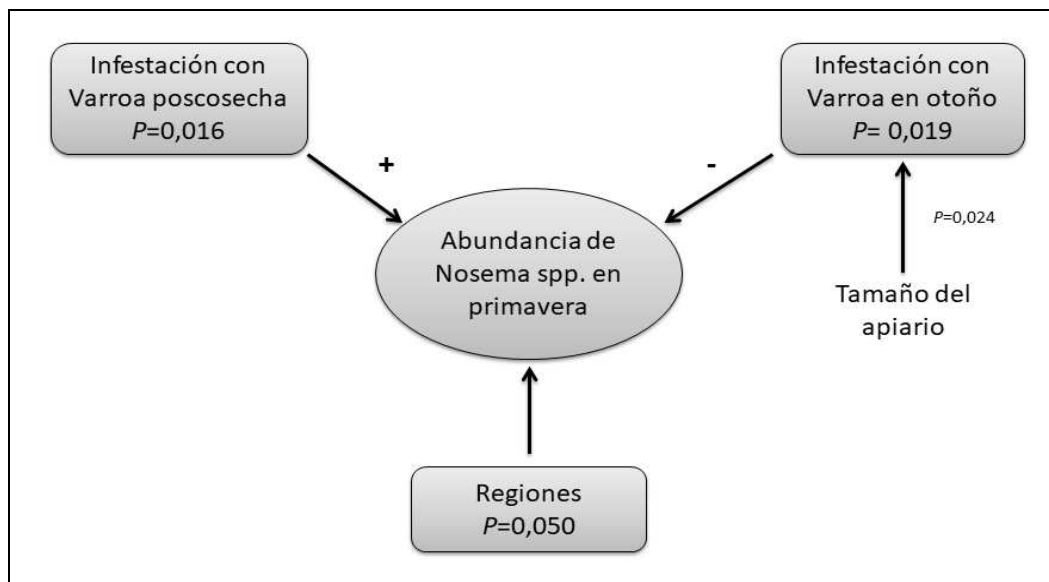


Figura 5. Asociación de variables obtenidas del análisis multivariado.

Análisis espacial

Período de muestreo de otoño

Se detectaron tres *clusters* significativos en la región estudiada ($P < 0,05$). Dos de ellos eran *clusters* de alta abundancia de esporos de *Nosema* spp., con un promedio dentro del grupo de 1.231.103 esporos/abeja (47 colmenas) y 365.065 esporos/abeja (cinco colmenas). El *cluster* de baja abundancia de esporos de *Nosema* spp. incluyó 133 colmenas y mostró una media de 87.867 esporos/abeja, mientras que la media fuera de este *cluster* fue de 365.065 esporos/abeja (Figura 4A).

Las colmenas incluidas en los dos *clusters* de alta abundancia de esporos de *Nosema* spp. se encontraron en la región del Centro de Santa Fe (89%) y en la región del Chaco Semi-árida (11%). Cabe destacar que las colmenas de la última región nombrada pertenecen a un solo apiario por lo que no podrían considerarse como un grupo espacialmente agrupado. Casi el 50% de las colmenas ubicadas en el *cluster* de baja tasa de esporos de *Nosema* spp. se encontraban bajo árboles de hojas perennes ($P < 0,001$). El 72% de las colmenas que se encontraban en el *cluster* de baja tasa, realizaban recambio de reinas ($P = 0,014$) y a su vez estaban circundadas por monte y pastizal ($P < 0,001$). Por otra parte, el 88,5% de las colmenas que se encontraban en el *cluster* de alta tasa presentaban menos de 1% de infestación con Varroa ($P = 0,001$).

Período de muestreo de primavera

Se detectaron dos grupos significativos en la región estudiada ($P < 0,05$). Un *cluster* de alta abundancia de esporos de *Nosema* spp. con un promedio de 5.351.197 esporos/abeja en el interior (19 colonias) y un *cluster* de baja abundancia de esporos de *Nosema* spp. con un promedio de 61.970 esporos/abeja en el interior (91 colonias) (Figura 4B). El *cluster* de baja abundancia se encontró representado por colmenas de todas las regiones. Para el caso del *cluster* de alta tasa, solo se encontraron colmenas pertenecientes a la región de Chaco Húmedo, el 89% de dichas colmenas tenían un nivel de infestación de *Varroa* $< 1\%$ en otoño ($P = 0,035$). El 81% de las colmenas que se encontraban en el *cluster* de baja tasa se encontraban en apiarios con menos de 50 colmenas, mientras que, por otro lado, el 74% de las colmenas de *cluster* de alta tasa se encontraban en apiarios con más de 50 colmenas ($P < 0,001$).

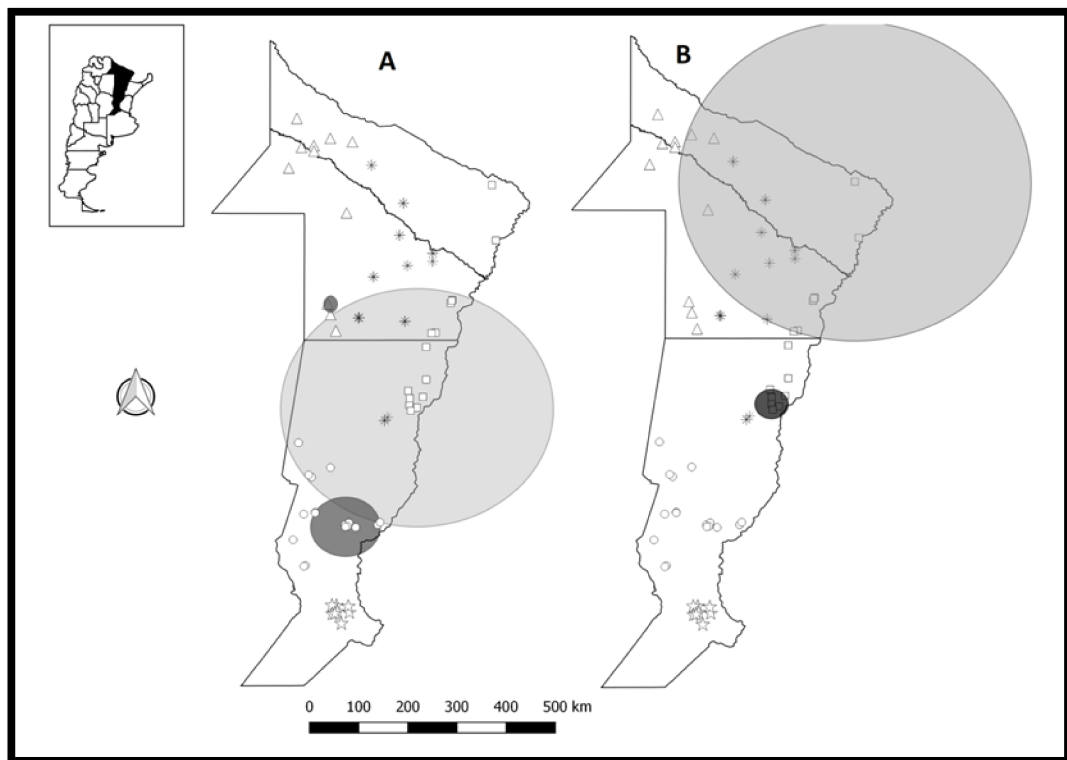


Figura 4. Distribución de *clusters* en otoño (A) y en primavera (B) en apiarios localizados bajo climas templados y subtropicales de Argentina. Gris oscuro= *cluster* de alta abundancia de *Nosema* spp. Gris claro= *cluster* de baja abundancia de *Nosema* spp.

Discusión

Fortaleza y producción de miel

El análisis realizado en el presente capítulo nos permite concluir que en las diferentes regiones analizadas no existió un efecto significativo en la modificación de los parámetros de fortaleza y la producción de miel con relación a las cargas esporulares de *Nosema* spp. Esto podría indicar que en las regiones bajo estudio la presencia de altas cargas de esporos de *Nosema* spp. puede no tener un impacto directo en el estado de las colmenas, como así también, en la producción de miel. En trabajos realizados en Uruguay, donde se evaluó el desarrollo de la parasitosis con distintos tratamientos y suplementando con polen se pudo constatar que las altas cargas de la enfermedad no afectaron los parámetros de fortaleza de las colmena [301].

Determinación genética de Nosema spp.

Del capítulo 3 de la presente tesis, se desprende un trabajo publicado donde se identificó una mayor proporción de abejas co-infectadas y una proporción importante de infecciones puras por *N. apis* que las observadas en el presente capítulo [279]. Para el momento otoño, los resultados obtenidos dan cuenta de la presencia de *N. ceranae* en más de 95% de las muestras positivas. Los resultados presentados en este capítulo son consistentes con el estudio publicado por Medici et al. [211] que mostró un predominio de *N. ceranae* en las muestras analizadas en clima templado. Una posible explicación de las discrepancias observadas puede deberse a variaciones en el patrón de ocurrencia de las especies a lo largo del año en diferentes climas, dado que los resultados informados en el presente capítulo se realizaron en otro momento del año. Sin embargo, se deben realizar más estudios para determinar los patrones de distribución de ambas especies a lo largo del año y en condiciones agro-ambientales contrastantes. Por otro lado, las técnicas moleculares para la identificación de especies de *Nosema* spp. han sido cuestionadas en algunos trabajos, dado que los métodos para identificar especies se basan en diferencias de las secuencias específicas de las especies de *Nosema* spp. en el gen 16S ARNr. Los trabajos indicaron que estos métodos pueden conducir a resultados confusos debido a los polimorfismos y la recombinación de copias múltiples del gen ARNr 16S de ambas especies [91]. Existen diferencias en las secuencias de *primers* utilizadas por los distintos grupos de estudio de *Nosema* spp. [90]. Una prueba de la especificidad y límites de detección de distintos conjuntos de primer sugiere que algunos de ellos pueden carecer de especificidad o exhibir una baja sensibilidad [90]. Además, el uso de diferentes métodos moleculares o condiciones en los laboratorios puede llevar a inconsistencias. Los resultados dispares con relación a lo reportado por otros estudios conducidos en distintas regiones de Argentina, podrían indicar que existen discrepancias entre los resultados arrojados por las diferentes técnicas empleadas para la identificación de las especies en estudio. Por tal motivo, se deberían realizar esfuerzos para

determinar un protocolo conjunto que permita identificar de manera precisa y confiable cada especie.

Por otro lado, se constataron variaciones temporales y regionales en la abundancia de *Nosema* spp. y se identificaron posibles factores que contribuyen a esta ocurrencia. Dentro del área de estudio, hubo una variación ambiental considerable, que es uno de los factores más importantes asociados con la aparición de ambas especies de microsporidios. La ubicación en donde se localizan las colmenas y las cargas de *Varroa* tanto en post-cosecha como en el otoño, fueron los factores asociados a mayores cargas de esporos de *Nosema* spp.

Efecto Varroa

Con relación a la identificación de factores asociados a la presencia de *Nosema* spp., los niveles de parasitación con *V. destructor* fue la variable asociada independientemente del momento analizado. No obstante, la interacción entre los patógenos varió según la temporada. Al considerar los resultados obtenidos en el capítulo precedente, podemos afirmar que entre la primavera y el otoño siguiente (post-cosecha) hay poco o ningún control de la infestación de *Varroa* por parte de los apicultores, por lo que probablemente *Varroa* y *Nosema* spp. actúan sinérgicamente. Sin embargo, una vez que el apicultor controló *Varroa* a principios de otoño (por ejemplo, la aplicación del tratamiento con acaricida sintético), interrumpe la relación entre ellos. Las colmenas que mostraron un nivel de infestación de *Varroa* inferior al 1% presentaban una abundancia de *Nosema* spp. significativamente mayor que aquellas colonias con una infestación persistente con *Varroa* (>1%) después del tratamiento. El efecto de un tratamiento con acaricida combinado con la reducción natural de las celdas de cría en otoño, podría haber contribuido a reducir las cargas de *Varroa*. Por el contrario, el efecto de la dinámica de la población de abejas (más abejas adultas /celdas de cría) y el comportamiento durante el otoño (número de días de vuelo) podrían tener un efecto diferente en la presencia de *Nosema* spp., congregando un mayor número de abejas adultas dentro de las colmenas [281] y propiciando el contagio entre abejas infectadas con *Nosema* spp. Se ha reportado que el parasitismo provocado por *V. destructor* es capaz de modificar el desarrollo de *Nosema* a lo largo del ciclo anual en zonas de clima templado [258]. Poder corroborar esta información con colmenas que no estén expuestas a tratamientos acaricidas podría colaborar en la comprensión de la dinámica de ambos parásitos en las colmenas.

Estudios previos señalaron que la infección con *Nosema* spp. afecta el comportamiento de las abejas obreras, modificando el éxito de la remoción de *Varroa* en colmenas con abejas con alto índice de mortalidad de ácaros o alto comportamiento higiénico [83, 282]. En tal sentido, las

colmenas con alta abundancia de *Nosema* spp. pueden modificar el comportamiento defensivo aumentando la susceptibilidad a la infestación de *Varroa*, pudiendo comprometer la efectividad del tratamiento acaricida. Los resultados indican que aquellos apiarios que presentaron un porcentaje mayor al 3% de niveles de infestación con *Varroa* post-cosecha tuvieron más abundancia de *Nosema* spp. en primavera. Esto podría indicar que aquellos apiarios que se encontraban por encima del umbral de tolerancia (>3% de infestación por *Varroa*) antes del tratamiento con acaricida en otoño, aunque pudieron reducir los niveles de infestación por *Varroa* con el tratamiento, todavía eran susceptibles a ser infectados por *Nosema* spp. Esto apoya la idea de que controlar las infestaciones de *V. destructor* en las colmenas puede ser vital para mitigar las infecciones con *Nosema* spp. y que, del mismo modo, controlar las infecciones de *Nosema* spp. pueden ser beneficioso para controlar la propagación del ácaro *V. destructor* [257]. Ahora bien, con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la fortaleza de las colmenas fue analizada y no se vió afectada por el desarrollo de la *Nosema* spp., lo que estaría indicando que, a pesar de tener altas cargas en distintos momentos del año, el efecto de *Nosema* no registra grandes inconvenientes en las colmenas. Signorini y colaboradores [9], realizaron un trabajo analizando la efectividad de la aplicación de fumagilina de forma mensual o en relación al nivel de cargas esporulares que presentaban las colmenas en distintas regiones. En dicho trabajo, se pudo determinar que la *Nosema* spp. no generó un impacto importante en las colmenas. Del mismo modo, otros autores afirman en base a sus investigaciones que *N. ceranae* por sí sola, sin otro factor adverso ya sea nutricional, presencia de *Varroa*, intoxicación con agroquímicos no produce efectos sobre las pérdidas invernales en las colmenas ni altera el desarrollo en la primavera [262, 276, 284]. Con relación a este último punto, y dado que más de 80% de los apicultores encuestados realizaron algún tipo de tratamiento para controlar *Varroa*, se puede indicar que sin dicho control, las colmenas habrían estado seriamente afectadas por *Varroa*, lo que podría favorecer el desarrollo de *Nosema*. Debido al conocimiento actual sobre los problemas inmunitarios que ocasiona *Varroa* en las abejas es preponderante aunar esfuerzos en desarrollar técnicas de control de la *Varroa* de manera eficiente para reducir el efecto conjunto que puede ocasionar la acumulación de patógenos en las colmenas.

Efecto regional

Los factores climáticos tienen un impacto significativo en el ciclo de vida de *Nosema* spp, por lo que la Nosemosis tiende a desarrollar esporulaciones más altas en climas fríos y húmedos [5, 283]. Sin embargo, observamos que la región semiárida del Chaco (región con mayor temperatura y menor humedad de nuestro estudio) presentó un apiario que mostró los niveles más altos de abundancia de *Nosema* spp. en otoño. Por un lado, este resultado podría explicarse por una precipitación inusual observada a fines del verano de 2015, seguida de una caída gradual de la temperatura, por lo que aparentemente hubo "una carga latente del parásito"

que aumentó cuando la humedad inusual proporcionó un ambiente favorable para su propagación [5, 283]. El confinamiento de las abejas durante un largo período de tiempo debido a la lluvia durante una etapa crítica del año seguida de días más fríos podría haber favorecido el desarrollo de la Nosemosis. Por otro lado, más que un efecto geográfico, estos resultados pueden explicarse por las prácticas de manejo aplicadas en este apiario, ya que la mayoría de estas prácticas surgieron como factores de riesgo en este estudio. En dicho apiario, las colmenas se alimentaron con polivitamínicos, no se realizó el reemplazo de la reina y se encontraban rodeados principalmente por cultivos, tres de los factores que estuvieron asociados a las cargas más elevadas de esporos de *Nosema* spp. en otoño. Con relación a estos factores, se ha documentado en el capítulo previo que el uso de polivitamínicos es un factor que puede aumentar los niveles de *Nosema* spp. y como se discutió previamente, se conocen trabajos que informan sobre el aumento de los niveles esporulares de *Nosema* al suplementar con polivitamínicos. Pero, a su vez, ese efecto es beneficioso ya que aumenta la supervivencia de las abejas en comparación con aquellas que no son alimentadas con dichos suplementos [116, 117, 118, 300]. La necesidad del uso de suplemento, surge debido a una reducción en la disponibilidad de alimento en el ambiente. Dicha reducción se debe en gran parte al actual modelo productivo, donde se reduce al máximo la disponibilidad de recursos florales en el ambiente. Esta situación sumada al uso de agroquímicos, repercute en la nutrición y en forma concomitante en la sanidad. Por tal motivo, es de esperar que en aquellas zonas donde el predominio de ambientes que circundan a las colmenas sean cultivos, se vea un aumento en las cargas de esporos de *Nosema* spp.

Prácticas de manejo y su efecto regional

Por último, la práctica del recambio de reinas presenta implicancias con relación a la sanidad de las abejas, se ha reportado en diferentes trabajos que el reemplazo de reinas reduce las cargas de esporos de *Nosema* spp. [84, 156]. Por otro lado, la reducción en las infestaciones de *Varroa* también se ha visto asociada al recambio de reinas entre los dos años posteriores a su introducción en las colmenas [280]. Esta práctica de manejo fue significativa en el análisis de nuestros datos y estuvo fuertemente asociada a cargas altas de *Nosema* spp. en aquellos apiarios que realizaban recambio cada más de dos años posteriores a su introducción en la colmena. Con base en los resultados de trabajos previos, es sumamente importante la implementación en estrategias de control de la Nosemosis, ya que se pudo comprobar un efecto directo al ver menos cargas de *Nosema* spp. en colmenas que recambian las reinas cada dos años como máximo y un efecto indirecto, ya que, el recambio cada uno o dos años se vio asociado a los porcentajes más bajos de infestación con *Varroa*.

Las colonias completamente expuestas al sol mostraron la mayor abundancia de esporos de *Nosema* spp. en otoño. Al parecer, la ubicación del apiario no es *per se* el factor principal, ya que

estuvo asociado de manera simultánea a otras variables. Al considerar estas asociaciones podemos indicar que las colmenas expuestas al sol directo y árboles de hojas caducas, se encontraban ubicadas exclusivamente en regiones de clima templado (Sur y Centro de Santa Fe) y estaban rodeadas principalmente por cultivos. Al contrario, las colmenas ubicadas bajo árboles de hojas caducas y perennes se ubicaban en regiones de Chaco y se encontraban rodeadas principalmente por monte y pastizal. Ambos factores asociados dan cuenta de que existen prácticas que se comparten en las distintas regiones y que se asocian a variables ambientales. La ubicación de colmenas en distintas regiones tiene un componente climático fuerte que imposibilita, por ejemplo, la ubicación bajo el sol directo de colmenas en regiones de Chaco donde las temperaturas pueden ser muy elevadas. A la inversa, en clima templado, puede existir la ocurrencia de colmenas al sol directo o bajo árboles de hojas caducas debido a que las condiciones climáticas son menos rigurosas en verano y pueden existir inviernos con bajas temperaturas. Por otro lado, con relación a las deficiencias nutricionales propias de los ambientes agrícolas, se tienen registros que están fuertemente vinculadas a la presencia de *Nosema* spp. [152, 243]. Por tal motivo era de esperar que las colmenas de regiones templadas (predominantemente agrícolas) mostraran una mayor abundancia de los esporos de *Nosema* spp. La ocurrencia de Nosemosis durante el otoño se asoció principalmente con un grupo de factores interconectados, incluido el clima (templado/subtropical) y la vegetación circundante (cultivos/monte) y no tanto a la presencia de factores individuales como, por ejemplo, la ubicación del apiario. El modelo expuesto en este trabajo, no pudo reflejar esta complejidad y la distribución de patrones regionales también se observó en el capítulo previo sobre factores de riesgo en el momento post-cosecha. Los resultados dan cuenta de variaciones ambientales que asocian ciertas variables que se practican con sus variantes en cada región. Esta información nos permite concluir que el efecto ambiental suele ser más fuerte que las prácticas asociadas que se realizan en cada región por separado.

Como se mencionó anteriormente, las diferencias regionales también se asociaron con particularidades en el manejo apícola y los recursos de floración. Algunas prácticas apícolas empleadas tradicionalmente en el sur y centro de Santa Fe, aún no se han implementado en las regiones subtropicales del Chaco. Sin embargo, la biodiversidad de las regiones chaqueñas proporciona un entorno más favorable para la apicultura, en comparación con las regiones templadas (sur y centro de Santa Fe), donde las áreas de forraje están actualmente afectadas por la intensificación de la agricultura y la aplicación de agroquímicos derivados [134]. Por esta razón, los apicultores que poseen apiarios ubicados en las regiones de Santa Fe tienen que realizar un manejo preciso de sus colmenas para evitar potenciales problemas debido a deficiencias nutricionales y riesgos químicos. Naug y Gibbs [73] encontraron alteraciones en el comportamiento de las abejas en respuesta a la apetencia provocada por *N. ceranae*. Este patógeno indujo un mayor nivel de apetencia y podría mediar cambios de comportamiento que

alteran la dinámica de transmisión de *Nosema* spp. En un estudio realizado por Di Pasquale [152] donde se analizó la influencia del polen en la salud de las abejas, concluyeron que la disponibilidad de diferentes recursos florales, como se puede observar comúnmente en las regiones del Chaco, podría cubrir la influencia limitada de algunos pólenes y mejorar la tolerancia a la infección por *Nosema* spp. Un estudio realizado por Jack et al. [118] demostró que la dieta con mayor cantidad de polen aumenta la intensidad de *N. ceranae*, pero también aumenta la supervivencia o la longevidad de las abejas. Del mismo modo, Basualdo [117] concluyeron que una dieta natural induce mayores niveles de desarrollo de proteínas y parásitos, pero la supervivencia de las abejas también fue mayor que con las dietas no naturales. De acuerdo a nuestros resultados y los presentados podemos afirmar que la disponibilidad de alimento de calidad es fundamental para permitir a las abejas un bajo desarrollo de la parasitosis como así también, en casos de suplementación, aumentar la supervivencia de las abejas con altos niveles de parasitación.

Análisis espacial

La ubicación y las características de los *clusters* proporcionan información sobre las condiciones que son favorables para el desarrollo y la propagación de la enfermedad [127]. Se determinaron, a lo largo del período bajo estudio, tres *cluster* de alta tasa de infestación con *Nosema* spp., dos de los cuales se encontraron en otoño y uno durante la primavera. Las regiones que representaban dichos *clusters* estaban en relación directa con las que presentaron los niveles más altos de esporos de *Nosema* spp. en post-cosecha y en otoño. Sin embargo, en la primavera hubo un *cluster* de alta tasa ubicado en la región del Chaco Húmedo, en particular un grupo pequeño ubicado al sur de esta región. La distribución de conglomerados podría estar indicando un efecto ambiental o de manejo en los apiarios ubicados en esa región, como en el caso del apiario de Chaco semi-árido en otoño. Al analizar por separado aquellos apiarios que presentaron valores extraordinarios, se puede verificar que existen ciertos factores de manejo, como el tamaño del apiario, el recambio de reinas, el suministro de polen y otros factores relacionados con el entorno circundante en el que se encontraron los apiarios identificados con altas tasas de *Nosema* spp. En este caso, la implementación de las variables antes mencionadas en conjunto, jugó un papel más importante en estas regiones de Chaco que el hecho de encontrarse en una región donde no es frecuente encontrar altas cargas parasitarias. Por tal motivo, es fundamental tener en cuenta que, aunque la Nosemosis tiene un fuerte componente ambiental, puede estar regulada por prácticas de manejo asociadas a los ambientes en los cuales se encuentran las colmenas.

Para la variable infestación con *Varroa*, los *clusters* fueron consistentes con lo representado por los modelos, encontrando asociaciones inversas entre las cargas de esporos de *Nosema* spp. en relación con *Varroa*, tanto en el otoño como en la primavera.

Conclusiones

- ✓ Tanto las regiones agro-ecológicas como la presencia de *Varroa* son factores preponderantes que explicarían el nivel de infección de Nosemosis en los momentos de muestreo de otoño y primavera.
- ✓ Existe un gradiente regional de norte a sur en la abundancia de *Nosema* spp. que se relaciona en términos generales con los factores ambientales, de salud y nutricionales.
- ✓ Las regiones de Chaco presentaron variaciones en algunos casos puntuales, siendo determinados posibles factores de manejo que soslayan el efecto del ambiente.
- ✓ La prevalencia de *Varroa* fue otro de los factores asociados con la abundancia de esporas de *Nosema* spp. no pudo determinarse una sinergia en el otoño y en la primavera, sin embargo, el momento post-cosecha indicó que las altas prevalencia de *Nosema* spp. en las colmenas estaban asociadas a prevalencia de *Varroa* superior al 3%, el efecto de ambos patógenos, puede tener efecto directo en el sistema inmune de las abejas, haciéndolas más débiles y susceptibles a otras patologías o factores de estrés.
- ✓ Para las regiones en estudio y el año en el que se llevó a cabo el trabajo no se pudo determinar un efecto de altos esporos de *Nosema* spp. sobre la producción de miel y el estado de las colmenas analizadas.

DISCUSIÓN GENERAL

Discusión general

La Nosemosis es una parasitosis que se encuentra distribuida en la mayoría de los apiarios del mundo. Sin embargo, hasta la actualidad existe gran controversia sobre el papel que juegan tanto *N. apis* como *N. ceranae* en la mortalidad de colmenas.

En el presente trabajo se registraron resultados que refuerzan algunas ideas con relación a la parasitosis. Con base en los datos presentados, se registró un patrón característico de esporos de *Nosema* a lo largo del año, siendo dicho patrón similar a lo observado en otras regiones de Argentina y del mundo [8, 64, 169]. Los niveles máximos de esporulación se registraron al finalizar la invernada y el comienzo de la primavera, este patrón presentó características similares a lo reportado para la especie *N. apis* [169, 181, 182, 183, 184]. Por otro lado, las intensidades de la infección se vieron relacionadas con las regiones donde se encontraban los apiarios, siendo las regiones de climas templados (regiones de Santa Fe) las que presentaron las intensidades más elevadas, con algunas excepciones en distintos momentos del año.

Por otro lado, se determinó las especies que se encuentran parasitando las abejas en las regiones en estudio en el período post-cosecha. Los resultados arrojaron diferencias en las proporciones observadas de las especies con relación a lo reportado por otros autores para otras regiones del país [211, 213]. Los datos dan cuenta de una mayor proporción de *N. ceranae* en las regiones agro-ecológicas del sur, seguido por co-infecciones en todas las regiones y por último infecciones puras de *N. apis* exclusivamente en el norte. Estos resultados podrían aportar sustento a la hipótesis que indica que *N. ceranae* estaría desplazando a *N. apis* [4, 5, 6, 39, 230]. Asimismo, no se pudo determinar la asociación entre los haplotipos de *A. mellifera* y las especies de *Nosema* spp. No obstante, resta analizar la totalidad de las muestras de cada región para descartar la asociación.

Para realizar un estudio epidemiológico, se requiere conocer cuáles son los factores que propician el desarrollo o la ocurrencia de una enfermedad. En el presente trabajo, se determinaron los factores de riesgo en distintos momentos del año apícola, los cuales resultan ser claves en el desarrollo de la parasitosis en estudio y de los hospedadores que la padecen. Los factores que se presentaron en cada uno de los momentos de muestreo fueron las regiones en donde estaban localizados los apiarios y el porcentaje de infestación con *Varroa*.

Ha sido reportado por muchos autores que la Nosemosis presenta un componente climático muy fuerte. En el presente trabajo se pudo corroborar dicha afirmación, ya que las colmenas con mayores recuentos de esporos de *Nosema* spp. estaban caracterizadas por encontrarse en regiones de clima templado [5, 66, 253, 254]. Por otro lado, asociado al componente ambiental, se destaca la nutrición de las abejas, siendo las regiones con mayor intensidad de cultivos las

que presentaron los mayores niveles esporulares. El actual modelo productivo provoca una fuerte reducción de la disponibilidad floral, sumado al paquete de insumos que se aplican en los cultivos generan un debilitamiento que hace propicio el desarrollo de las distintas parasitosis en las colmenas [116, 117, 147, 134, 255].

Otro de los factores asociados a los niveles más elevados de *Nosema* spp. fue el porcentaje de infestación con *Varroa*. Los mayores niveles de recuento de esporos se asociaron, a finales de la temporada de cosecha, a los porcentajes de *Varroa* por encima del umbral de daño y en los muestreos de otoño y primavera se asociaron a porcentajes de *Varroa* por debajo de dicho umbral. Estos resultados pueden estar indicando que los porcentajes por encima del umbral de *Varroa* en post-cosecha hacen que los niveles de *Nosema* spp. se incrementen, llegando a niveles máximos en la primavera. Aunque los porcentajes de *Varroa* se hayan reducido debido a un tratamiento acaricida, los niveles de *Nosema* spp. continúan aumentando. Se conoce el efecto sinérgico que provocan ambos patógenos al actuar sobre las colmenas [83, 281, 282, 284], lo que resta por determinar es cuál de los dos patógenos genera que el siguiente se desarrolle en la colmena o si lo hacen en forma simultánea.

Se identificaron regiones que presentaron situaciones particulares en momentos determinados. En dichas situaciones un grupo de factores relacionados al manejo del apiario estuvieron asociados a los recuentos altos. Factores como el recambio de reina con una periodicidad de dos años como máximo, propicia el buen desarrollo de la colmena, teniendo reinas prolíficas que limitan el desarrollo de patologías como la presentada en la presente tesis. Por otro lado, el uso de polivitamínicos o polen suele ser una práctica habitual en momentos donde la escasez de alimento dificulta el buen desarrollo de la colmena. Sin embargo, esta última herramienta puede acarrear niveles altos de *Nosema* spp cuando las colmenas ya se encuentran parasitadas, favoreciendo la proliferación del parásito en el interior de las abejas, pero también alargando la supervivencia de las mismas [116, 117, 118].

Finalmente, las colmenas que se encontraban con mayores cargas esporulares de *Nosema* spp. no reportaron diferencias en los parámetros de fortaleza de la colmena, cuadros con abeja, cría, miel y polen en relación a aquellas que tenían menores cargas esporulares. Tampoco se vieron diferencias con relación a la producción de miel. Estos resultados podrían estar indicando, como ya se ha reportado en otras regiones, que *Nosema* spp. no tiene efectos directos sobre las colmenas por sí sola y que hay que considerar otros factores que pueden estar asociados con este patógeno, como el estrés nutricional, la presencia de *Varroa* o intoxicaciones con agroquímicos [169, 276, 284].

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones generales

- ✓ Tanto el recuento de esporas como la prevalencia de *Nosema* spp. registraron un patrón similar de distribución a lo largo del año en todas las regiones analizadas, diferenciándose entre ellas sólo en sus intensidades.
- ✓ Las mayores abundancias de esporas de *Nosema* spp. se registraron en las regiones de clima templado y fueron disminuyendo hacia regiones de clima subtropical.
- ✓ *N. ceranae* se encuentra en los apiarios de todas las regiones agro-ecológicas bajo estudio, aunque en mayor proporción en las regiones del sur. Las co-infecciones se registraron en todas las regiones, siendo más frecuentes en el centro. Por su parte, *N. apis* se encontró sólo en regiones de clima subtropical. Este patrón podría estar indicando un desplazamiento de *N. apis* por *N. ceranae*.
- ✓ Los resultados sobre la presencia de las diferentes especies de *Nosema* spp. variaron considerablemente en los momentos analizados. En el segundo muestreo en casi un 100% la especie presente en las colmenas fue *N. ceranae*.
- ✓ Las regiones agro-ecológicas y los porcentajes de parasitación con *Varroa* fueron los factores de riesgo asociados a altos niveles esporulares de *Nosema* spp.
- ✓ Tanto las variaciones climáticas, como la disponibilidad nutricional de cada región fueron determinantes para el desarrollo de la parasitosis.
- ✓ El control de las cargas parasitarias de *Varroa* posteriores a la cosecha de miel se constituye en una medida de manejo que previene los incrementos esporulares de *Nosema* spp.
- ✓ La parasitosis no presentó un efecto directo en la producción de miel ni en el estado general de las colmenas. Lo anterior indicaría que, a pesar de encontrarse niveles elevados en algunas regiones, el parásito no genera graves daños en la colmena.
- ✓ La presencia de *Nosema* spp. no genera por sí sola una patología diferenciable. Su patogenicidad estaría condicionada a las características climáticas y disponibilidad floral de las diferentes regiones agro-ecológicas y a la pre-existencia de otros patógenos, fundamentalmente *V. destructor*.

Perspectivas

Resta contestar algunos interrogantes que surgen con relación a la Nosemosis:

- ✓ En cuanto al diagnóstico de la parasitosis, es importante unificar criterios para determinar la metodología más adecuada para estimar los niveles de parasitación y su impacto en la sanidad de las colmenas.
- ✓ Este primer punto permitirá determinar, por otro lado, posibles umbrales de daño en distintas regiones.
- ✓ Aunque no se pudieron encontrar evidencias estadísticas de la asociación entre el haplotipo de abeja y la especie de *Nosema* spp., aún no es posible descartar esta hipótesis y se deberían realizar mayores estudios en este sentido.
- ✓ Para poder determinar el posible desplazamiento de las especies de *Nosema* spp., sería propicio realizar una curva de esporulación, durante más de un año, que indique las proporciones de las distintas especies de *Nosema* spp. Con relación a este punto, también restaría estandarizar técnicas de PCR para la determinación de las especies.
- ✓ Se debería determinar cuál de los dos patógenos (*V. destructor* o *Nosema* spp.) es el estresor principal.
- ✓ Todas las prácticas de manejo que fueron identificadas como factores de riesgo de la presencia de *Nosema* spp. deberían ser evaluadas en forma experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- [1] F Vasquez, H Castignani (2018). El Mercado Apícola. Informe de Coyuntura Mensual, Cadena Apícola. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Apicultura/documentos/MIEL_177_ANEXO.pdf. Acceso: Noviembre 2018.
- [2] GR Williams, MA Sampson, D Shutler, REL Rogers (2008). Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 342–344.
- [3] M Higes, R Martín Hernandez, A Meana (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 93–95.
- [4] Y Chen, JD Evans, IB Smith, JS Pettis (2008) *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 186–188.
- [5] I Fries (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*A. mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 573-579.
- [6] RJ Paxton, J Klee, S Korpela, I Fries (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38: 558-565.
- [7] EG Sarlo (2010). Aportes al conocimiento de la naturaleza y control de la Microsporidiosis causada por *Nosema ceranae* (Microsporidia, Nosematidae) en las colonias de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) asentadas en la región sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales .Universidad Nacional de Mar del Plata, pp 162.
- [8] A Giacobino, R Rivero, A Molineri, N Bulacio-Cagnolo, J Merke, E Orellano, C Salto, M Signorini. (2016). Fumagillin control of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) infection in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies in Argentina. *Veterinaria Italiana* (52): 145–151.
- [9] ML Signorini, AI Molineri, NV Bulacio Cagnolo, J Merke, S Luiselli, J Caporgno (2014). Evaluación a campo de la efectividad del tratamiento contra Nosemosis en apiarios de la provincia de Santa Fe. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 9 (1): 7-16.
- [10] P Agnew, JJ Becnel, D Ebert, Y Michalakis (2006). Chapter 10 – Symbiosis of Microsporidia and Insects. En: *Insect symbiosis – Vol II*. Ed. CRC Press, Danvers, MA. USA, p. 145-163.
- [11] P Kelling (2014). Chapter 10 - Phylogenetic Place of Microsporidia in the Tree of Eukaryotes. En: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, First Edition. Ed. by Louis M. Weiss and James J. Becnel, 195-202.
- [12] LM Weiss, (2003). Microsporidia 2003: IWOP-8. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(s1), 566–568.
- [13] TY James, F Kauff, CL Schoch, PB Matheny, V Hofstetter, CJ Cox, GJ Celio, C Gueidan, E Fraker, J Miadlikowska, HT Lumbsch, A Rauhut, V Reeb, AE Arnold, A Amtoft, JE Stajich, K Hosaka, GH Sung, D Johnson, B O'Rourke, M Crockett, M Binder, JM Curtis, JC Slot, Z Wang, AW Wilson, A Schussler, J Longcore, K O'Donnell, S Mozley-Standridge, D Porter, PM Letcher, M Powell, JW Taylor, MM White, GW Griffith, DR Davies, RA Humber, JB Morton, J Sugiyama, AY Rossmann, JD Rogers, D Pfister, D Hewitt, K Hansen, S Hambleton, RA Shoemaker, J Kohlmeyer,, B Volkmann-Kohlmeyer, RA Spotts, M Serdani, PW Crous, KW Hughes, K Matsuura, E Langer, WA Untereiner, R

- Lucking, M Budel, R Yahr, DS Hibbett, F Lutzoni, DJ McLaughlin, JW Spatafora y R Vilgalys (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- [14] PJ Keeling, NM Fast (2002). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56(1): 93–116.
- [15] CT Ku, CY Wang, YC Tsai, CC Tzeng, CH Wang (2007). Phylogenetic analysis of two putative *Nosema* isolates from Cruciferous Lepidopteran pests in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(1): 71–76.
- [16] P Keelling, N Fast, J Law, A Williams, C Slamovits (2005). Comparative genomics of microsporidia. *Fol. Parasitol.* 52 (1-2): 8-14.
- [17] H El Alaoui, J Bata, D Bauchart, JC Doré, CP Vivarès (2001). Lipids of Three Microsporidian Species and Multivariate Analysis of the Host–Parasite Relationship. *Journal of Parasitology*, 87(3): 554–559.
- [18] E Weidner, AM Findley, V Dolgikh, J Sokolova (1999). Microsporidian biochemistry and physiology. En: *The Microsporidia and Microsporidiosis* Ed: M. Wittner, ASM Press, Washington, D.C , p. 172–195.
- [19] C Franzen, A Müller (1999). Cryptosporidia and microsporidia—waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34(3): 245–262.
- [20] R Fayer, and M Santin-Duran (2014). Chapter 3. Epidemiology of microsporidia in human infections. En: *Microsporidia*. Ed: John Wiley & Sons, Inc. pp. 135–164.
- [21] E Nasonova, E Cornillot, G Méténier, N Agafonova, B Kudryavtsev, S Skarlato, CV Vivarés, (2005). Chromosomal composition of the genome in the monomorphic diplokaryotic microsporidium *Paranosema grylli*: análisis by two-dimensional pulsed field gel electrophoresis. *Folia Parasitologica* 52: 145-157.
- [22] Naegeli, K. 1857. Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Z.* 15:760–761.
- [23] Pasteur, L. (1870). *Étude sur la maladie des vers à soie*, Paris
- [24] T Singh, MM Bhat, MA Khan (2012). Microsporidiosis in the Silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera:Bombycidae). *Tropical Agricultural Science*, 35 (3): 387- 406.
- [25] K Guo-Ping, G Xi-Jie, (2011). Overview of silkworm pathology in China. *African Journal of Biotechnology*, 10(79):18046-18056.
- [26] DM Caron, LJ Connor, (2013). *Honey bee biology and beekeeping*. Ed: Wicwas Press pp 368.
- [27]. White, G. F. 1909. *Nosema* disease. *USDA Bull* N° 78, pp 57.
- [28] I Fries, F Feng, A da Silva, SB Slemenda, NJ Pieniazek (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.
- [29] M Higes, R Martín, A Sanz, N Álvarez, A Sanz, P García-Palencia, A Meana (2005). El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola*. 133:15–21.
- [30] S Plischuk, R Martín-Hernández, L Prieto, M Lucía, C Botías, A Meana, AH Abrahamovich, C Lange, M Higes (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by

- Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Env. Microbio. Rep.* 1, (2): 134-135.
- [31] Porrini, LP Porrini, PM Garrido, DP Porrini, F Muller, LA Nuñez, L Alvarez, PF Iriarte, MJ Eguaras (2017). *Nosema ceranae* in South American native stingless bees and social wasp. *Microbial ecology*, 74(4), pp.761-764
- [32] A Cali, PM Takvorian, (2014). Chapter 2: Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. En: *Microsporidia*, Ed: John Wiley & Sons, Inc. pp. 71–133.
- [33] E Weidner (1982). The microsporidian spore invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *The Journal of Cell Biology*, 93(3), 976–979.
- [34] ME Gray, ST Ratcliffe, ME Rice (2009). *Integrated pest management concepts, tactics, strategies and case studies*, Cambridge University Press, New York, NY.
- [35] C Botias. (2013). Patrón epidemiológico y nuevos métodos de control de las nosemosis de *Apis mellifera* en España. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Univeridad Computense de Madrid, pp 282.
- [36] M Gilliam, H Shimanuki (1967). In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(3), 387–389.
- [37] E Zander (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* 31: 196–204.
- [38] WF Huang, JH Jiang, YW Chen, CH Wang (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38(1): 30–37.
- [39] J Klee, AM Besana, E Genersch, S Gisder, A Nanetti, DQ Tam, TX Chinh, F Puerta, JM Ruz, P Kryger, D Message, F Hatjina, S Korpela, I Fries, RJ Paxton (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.
- [40] I Fries (1989). Observations on the Development and Transmission of *Nosema Apis* Z. In the Ventriculus of the Honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 28(2): 107–117.
- [41] L Bailey, BV Ball (1991). *Honey bee pathology*. Ed. Academic Press. pp 192.
- [42] TC Webster (1994). Fumagillin Affects *Nosema apis* and Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 87(3), 601–604.
- [43] L Bailey, (1955) The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology* 45(1-2): 86-94. 326/57.
- [44] R Larsson (1986). Ultrastructure, function, and classification of microsporidia. *Prog. Protistol.* 1:325–390.
- [45] A Borchert (1928) Beiträge zur Kenntnis des Bienenparasiten *Nosema apis*. *Arch. Für Bienenkd.* 9: 115–178.
- [46] I Fries, S Raina (2003). American foulbrood (*Paenibacillus larvae larvae*) and African honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Economic Entomology* 96(6): 1641–1646.
- [47] R Lotmar (1943). Bestehen Beziehungen zwischen der Witterung und dem seuchenhaften Auftreten der Frühjahrschwindsucht (Nosema-Amöben-Seuche)? *Schweiz. Bienenztg.* 66: 68–80.

- [48] I Fries (1988). Contribution to the study of nosema disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Ph D Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala, Sweden. Report 166.
- [49] YP Chen, JD Evans, C Murphy, R Gutell, M Zuker, D Gundensen-Rindal, JS Pettis (2009). Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2): 142–147.
- [50] W Steche (1960) Aetiologie und Therapie der Nosematose der Honigbiene. *Zeitschrift für Bienenforschung* 5(3): 49-52. 182/61.
- [51] Peng, B Baer-Imhoof, A Harvey Millar, B Baer (2015). Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports*, 5(1).
- [52] KE Roberts, WHO Hughes (2015). Horizontal transmission of a parasite is influenced by infected host phenotype and density. *Parasitology* 142(2): 395–405.
- [53] LA Malone, HS Gatehouse. (1998). Effects of *Nosema apis* Infection on Honey Bee (*Apis mellifera*) Digestive Proteolytic Enzyme Activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(2): 169–174
- [54] M Woyciechowski, D Moron (2009). Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insect. Sociaux* 56(2): 193–201.
- [55] M Goblirsch, ZY Huang, M Spivak (2013). Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. PLoS ONE, 8(3), e58165.
- [56] HL Holt, KA Aronstein, CM Grozinger (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 14(1): 799.
- [57] D De Graaf, H Raes, G Sabbe, P De Rycke, F Jacobs (1994). Early Development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the Midgut Epithelium of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 63(1), 74–81.
- [58] FE Moeller (1978). *Nosema* disease - its control in honey bee colonies. U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin No. 1569.
- [59] C Invernizzi, C Abud, IH Tomasco, J Harriet, G Ramallo, J Campá, H Katz, G Gardiol, Y Mendoza (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2): 150–153.
- [60] T Giersch, T Berg, F Galea, M Hornitzky (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, 40(2):117–123.
- [61] M Higes, R Martín-Hernández, C Botías, EG Bailón, AV González-Porto, L Barrios, MJ Del Nozal, JL Bernal, JJ Jiménez, PG Palencia, A Meana. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10): 2659–2669.
- [62] B Dainat, JD Evans, YP Chen, L Gauthier, P Neumann (2012). Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. PLoS ONE, 7(2), e32151.
- [63] J Stevanovic, P Simeunovic, B Gajic, N Lakic, D Radovic, I Fries, Z Stanimirovic (2013). Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie*, 44(5): 522–536.

- [64] S Gisder, K Hedtke, N Mockel, MC Frielitz, A Linde, E Genersch (2010). Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9): 3032–3038.
- [65] E Forsgren, E., I Fries (2012). Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1): 78–82.
- [66] MD Meixner, RM Francis, A Gajda, P Kryger, S Andonov, A Uzunov, G Topolska, C Costa, E Amiri, S Berg, M Bienkowska, M Bouga, R Büchler, W Dyrba, K Gurgulova, F Hatjina, E Ivanova, M Janes, N Kezic, S Korpela, Y Le Conte, B Panasiuk, H Pechhacker, G Tsoktouridis, G Vaccari, J Wilde (2014). Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. *Journal of Apicultural Research*, 53(2): 215–229.
- [67] C Dussaubat, A Maisonnasse, D Crauser, D Beslay, G Costagliola, S Soubeyrand, A Kretzchmar, Y Le Conte (2013). Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1): 42–51.
- [68] C Alaux, M Folschweiller, C McDonnell, D Beslay, M Cousin, C Dussaubat, JL Brunet, YL Conte (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(3): 380–385.
- [69] K Antúnez, R Martín-Hernández, L Prieto, A Meana, P Zunino, M Higes (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11(9), 2284–2290.
- [70] DM Eiri, G Suwannapong, M Endler, JC Nieh (2015). *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *PLOS ONE*, 10(5): e0126330.
- [71] C Mayack, D Naug, (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 185–188.
- [72] C Vidau, J Panek, C Texier, DG Biron, LP Belzunces, M Le Gall, C Broussard, F. Delbac, H El Alaoui (2014). Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 121: 89–96.
- [73] D Naug, A. Gibbs. 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40(6): 595–599.
- [74] G Borsuk, M Kozłowska, M Anusiewicz, J Paleolog (2018). *Nosema ceranae* changes semen characteristics and damages sperm DNA in honeybee drone. *Invertebrate Survival Journal*, 15: 197–202.
- [75] C Dussaubat, A Maisonnasse, C Alaux, S Tchamitchan, JL Brunet, E Plettner, LP Belzunces Y Le Conte (2010). *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, 36(5): 522–525.
- [76] JO Moffett, FA Lawson (1975). Effect of *Nosema*-Infection on O₂ Consumption by Honey Bees. *Journal of Economic Entomology*, 68(5): 627–629.
- [77] DI Wang, FE Moeller (1970). Comparison of the free amino acid composition in the hemolymph of healthy and *Nosema*-infected female honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15(2), 202–206.
- [78] DI Wang, FE Moeller (1971). Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of work honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 17: 308–320.

- [79] TP Liu (1990). Ultrastructure of mitochondria in the corpora allata of honeybees infected by *Nosema apis* before and after treatment with anti-Nosema drugs. *Tissue and Cell*. 22: 511-515.
- [80] I Fries, F Feng, (1995). Cross infectivity of *Nosema apis* in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. In: Proceedings of the Apimondia 34th International Apicultural Congress. Bucharest, Romania, pp. 151–155.
- [81] TP Liu, (1992). Oocytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. *Tissue Cell* 24: 131–138
- [82] M Hassanein (1951). Studies on the effect of infection with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey-bee. *Journal of Cell Science* s3 (92): 225-231.
- [83] C Botías, R Martín-Hernandez, A Meana, M Higes. (2012). Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research*, 110(6): 2557–2561.
- [84] C Botias, R Martín-Hernandez, E Garrido-Bailon, A Gonzalez-Porto, A Martínez-Salvador, P De La Rúa, A Meana, M Higes. (2012). The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science*, 93(1): 150–155.
- [85] A Meana, R Martín-Hernández, M Higes, (2010). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 49(2): 212–214.
- [86] MD Smart, WS Sheppard (2012). *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 148–151.
- [87] I Fries, MP Chauzat, YP Chen, V Doublet, E Genersch, S Gisder, M Higes, DP McMahon, R Martín-Hernández, M Natsopoulou, RJ Paxton, G Tanner, TC Webster, GR Williams (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1-28.
- [88] AL Bourgeois, TE Rinderer, LD Beaman, RG Danka (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(1): 53–58.
- [89] KL Burgher-MacLellan, GR Williams, D Shutler, K MacKenzie, REL Rogers (2010). Optimization of duplex real-time PCR with melting-curve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. *The Canadian Entomologist*, 142(3): 271–283.
- [90] S Erler, S Lommatzsch, HMG Lattorff (2011). Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitology Research*, 110(4): 1403–1410.
- [91] S Gisder, E Genersch (2013). Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1): 1–6.
- [92] R Martín-Hernandez, A Meana, L Prieto, AM Salvador, E Garrido-Bailon, M Higes (2007). Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20): 6331–6338.
- [93] BE Traver, RD Fell (2011). Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107(1): 43–49.
- [94] KA Aronstein, E Saldivar, TC Webster (2011). Evaluation of *Nosema ceranae* spore-specific polyclonal antibodies. *Journal of Apicultural Research*, 50(2): 145–151.
- [95] KA Aronstein, TC Webster, E Saldivar (2012). A serological method for detection of *Nosema ceranae*. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3): 621–625.

- [96] A Qandour, I Ahmad, D Habibi, M Leppard (2014). Remote beehive monitoring using acoustic signals. *Australian Acoustical Society* 42(3):204-209.
- [97] JJ Bromenshenk, CB Henderson, RA Seccomb, SD Rice, RT Etter inventors; J. Bromenshenk, Jerry, Henderson, B. Colin, Seccomb, et al. 2009. Honey bee acoustic recording and analysis system for monitoring hive health. US 11/651,349 patent.
- [98] M Carroll, A Duehl (2012). Collection of volatiles from honeybee larvae and adults enclosed on brood frames. *Apidologie* 43(6): 715–730.
- [99] M Higes, R Martín-Hernandez, A Meana (2010). *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41(3): 375–392.
- [100] JP van den Heever, TS Thompson, JM Curtis, SF Pernal (2015). Stability of dicyclohexylamine and fumagillin in honey. *Food Chemistry*, 179: 152–158.
- [101] JP van den Heever, TS Thompson, JM Curtis, A Ibrahim, SF Pernal (2014). Fumagillin: An overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 62(13): 2728–2737.
- [102] WF Huang, LF Solter, PM Yau, BS Imai (2013). *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogens* 9(3): e1003185.
- [103] S Gisder, E. Genersch (2015). Identification of candidate agents active against *N. ceranae* infection in honey bees: establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. *PLoS ONE*, 10(2): e0117200.
- [104] M Porrini, MC Audisio, D Sabaté, C Ibarra, S Medici, E Sarlo, PM Garrido, M Eguaras (2010). Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. *Parasitology Research*, 107(2): 381–388.
- [105] M Maggi, P Negri, S Plischuk, N Szawarski, F De Piano, L De Feudis, M Eguaras, C Audisio (2013). Effects of the organic acids produced by a lactic acid bacterium in *Apis mellifera* colony development, *Nosema ceranae* control and fumagillin efficiency. *Veterinary Microbiology*. 167(3-4): 474–483
- [106] L Maistrello, M Lodesani, C Costa, F Leonardi, G Marani, M Caldon, F Mutinelli, A. Granato (2008). Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39(4): 436–445.
- [107] C Costa, M Lodesani, L Maistrello (2010). Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie* 41(2): 141–150
- [108] YP Chen, J Pettis, Y Zhao, X Liu, L Tallon, L Sadzewicz, R Li, H Zheng, S Huang, X Zhang, MC Hamilton, SF Pernal, AP Melathopoulos, X Yan, JD Evans (2013). Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics* 14: 451
- [109] N Paldi, E Glick, M Oliva, Y Zilberberg, L Aubin, J Pettis (2010). Effective gene silencing in a Microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. *Applied Environmental Microbiology*, 76(17): 5960–5964.
- [110] GE Cantwell (1970). Standard methods for counting nosema spores. *American Bee Journal*, 110, 222–223.

- [111] H Katznelson, JA Robb. (1962). The use of gamma radiation from cobalt-60 in the control of diseases of the honeybee and the sterilization of honey. *Canadian Journal Microbiology*, 8(2): 175–179
- [112] Z Huang (2012). Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terrestrial Arthropod Reviews* 5(2): 175–189
- [113] Q Huang, P Kryger, Y Le Conte, HM Lattorff, FB Kraus, RA Moritz (2014). Four quantitative trait loci associated with low *Nosema ceranae* (Microsporidia) spore load in the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 45(2): 248–256.
- [114] AL Bourgeois, T Rinderer, HA Sylvester, B Holloway, B Oldroyd. (2012). Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. *Apidologie* 43(5): 539–548.
- [115] Y Mendoza, K Antunez, B Branchiccela, M Anido, E Santos, C Invernizzi (2014). *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie* 45(2): 224–234.
- [116] MP Porrini, EG Sarlo, S Medici, PM Garrido, DP Porrini, N Damiani, MJ Eguaras. 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: Influence of diet and infective inoculum. *Journal of Apicultural Research*, 50(1): 35–41.
- [117] M Basualdo, S Barragan, K Antunez (2014). Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Report*, 6(4): 396–400.
- [118] CJ Jack, SS Uppala, HM Lucas, RR Sagili (2016) Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees, *Journal of Insect Physiology* 87: 12–19.
- [119]. D vanEngelsdorp, E Lengerich, A Spleen, B Dainat, J Cresswell, BK Nguyen, V Soroker, R Underwood, H Human, Y Le Conte, C Saegerman (2013). Standard epidemiological methods to understand and improve *Apis mellifera* health. En: V Dietemann, JD Ellis, P Neumann. Ed: The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research*. 52(1): 1-16.
- [120] I Dohoo, W Martin H Stryhn (2003). Veterinary epidemiologic research. Charlottetown (Canada): AVC.
- [121] D Naug, S Camazine (2002). The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *Journal of Theoretical Biology*, 215(4): 427-439.
- [122] M Delgado Rodríguez J Llorca Díaz (2004). Estudios longitudinales: concepto y particularidades. *Revista Española de Salud Pública* 78(2): 141-148.
- [123] LA Waller, CA Gotway (2004). Chapter 7: Spatial Clustering of Health Events: Regional Count Data. En: Applied Spatial Statistics for Public Health Data. Ed: Wiley Series in Probability and Statistics, pp. 200-207.
- [124] J Snow. (1855). On the Mode of Communication by Cholera. Ed: London, pp 31.
- [125] MP Ward TE Carpenter (2000). Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(3-4): 257-284.
- [126] AH Auchincloss, SY Gebreab, C Mair, AV Diez Roux (2012). Review of Spatial Methods in Epidemiology, 2000–2010. *Annual Review Public Health*, 33(1): 107–22.

- [127] DU Pfeiffer, TP Robinson, M Stevenson, KB Stevens, DJ Rogers, AC Clements (2008). *Spatial Analysis in Epidemiology*, First Edition. Ed: Oxford University Press, Gran Bretaña 142 pp.
- [128] M Kulldorff, N Nagarwalla (1995). Spatial Disease clusters: detection and inference. *Statistics in Medicine*, 14(8): 799-810.
- [129] M Kulldorff , T Tango, PJ Park (2003). Power comparisons for disease clustering tests. *Computational Statistics & Data Analysis*, 42(4):665-684.
- [130] KR Smith (2006). Public payments for environmental services from agriculture: precedents and possibilities. *American Journal of Agricultural Economics*, 88(5): 1167–1173.
- [131] CA Ferrari, HR Currao, JF Bessone, R Otero, JA Collía (2011). La Apicultura y sus regiones. Una visión panorámica – 1ra Edición- Buenos Aires: Consejo Federal de Inversiones, pp 200.
- [132] R Burkart, NO Bárbaro, RO Sánchez, DA Gómez, (1999). Ecoregiones de la Argentina. [Ecoregions from Argentina]. Administración de parques nacionales. Buenos Aires. [Adobe Digital Editions version]. <http://www.sib.gov.ar/archivos/Eco-Regiones_de_la_Argentina.pdf> (acceso: 26.8.18).
- [133] R Giorgi, R Tosolini, V Sapino, J Villar, C León, A Chiavassa (2008). Zonificación Agroeconómica de la provincia de Santa Fe, Argentina. Ed: INTA 110, pp. 215–224.
- [134] Red de Información Agropecuaria Nacional [RIAN]. (2010). Zonificación RIAN Chaco y Formosa. EEA Saenz Peña, Chaco, Argentina: Ed: INTA.
- [135] F Riveros (2009). El gran Chaco. Retrieved from http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/counprof/spanishtrad/argentina_sp/granchaco/GranChaco_sp.htm. (acceso:26.8.2018)
- [136] C Dini, E Bedascarrasbure (2011). Manual de Apicultura para Ambientes Subtropicales: una propuesta de la Red de Escuelas del Noroeste Argentino. 1a. ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Ed: INTA, pp 240.
- [137] Y Le conte, M Navajas (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 27(2):485-97, 499-510.
- [138] P Neumann, NL Carreck (2010). Honey bee colony loss. *Journal of Apicultural Research* 49:1–6.
- [139] R Winfree, I Bartomeus, DP Cariveau, (2011) Native pollinators in anthropogenic habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42(1): 1–22
- [140] BF Kaluza, MH Wallace, TA Heard, V Minden, A Klein, SD Leonhardt (2018). Social bees are fitter in more biodiverse environments. *Nature, Scientific Reports* 8:12353.
- [141] SAS Greenleaf (2005). Local-scale and foraging-scale affect bee community abundances, species richness, and pollination services in Northern California. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- [142] NM Williams, J Regetz, C Kremen (2012). Landscape-scale resources promote colony growth but not reproductive performance of bumble bees. *Ecology* 93(5):1049-1058.
- [143] T Blacquiere, G Smagghe, CAM van Gestel, V Mommaerts. (2012) Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21(4):973–992.
- [144] AD Vaudo, JF Tooker, CM Grozinger, HM Patch. (2015) Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science* 10:133–141.

- [145] BF Kaluza, HM Wallace, TA Heard, V Minden, A Klein, SD Leonhardt (2018). Social bees are fitter in more biodiverse environments. *Nature, Science Reports* 8(1): 1-10.
- [146] G DeGrandi-Hoffman, Y Chen. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion Insect Science*, 10: 170–176.
- [147] C Alaux, F Ducloz, D Crauser, Y Le Conte (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letter* 6(4): 562–565.
- [148] G DeGrandi-Hoffman, Y Chen, E Huang, MH Huang (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1184–1191
- [149] DR Schmechl, PEA Teal, JL Frazier, CM Grozinger. 2014. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 71: 177–190.
- [150] TE Rinderer, K Dell Elliott (1977). Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: influence of diet. *Journal of Economic Entomology* 70(4): 431–433.
- [151] HQ Zheng, ZG Lin, SK Huang, A Sohr, L Wu, YP Chen (2014). Spore loads may not be used alone as a direct indicator of the severity of *Nosema ceranae* infection in honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae). *Journal of Economic Entomology* 107(6): 2037–2044
- [152] G Di Pasquale, M Salignon, Y Le Conte, LP Belzunces, A Decourtye, A Kretzschmar, S Suchail, JL Brunet, C Alaux (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE* 8: e72016.
- [153] DS Schneider, JS Ayres (2008). Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nature Reviews Immunology* 8(11): 889–895
- [154]. 157 A Giacobino, N Bulacio Cagnolo, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, G Masciangelo, H Pietronave, C Salto, M Signorini (2014) Risk factors associated with the presence of *Varroa destructor* in honey bee colonies from east-central Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*. 115(3-4): 280–287.
- [155]. C Botías, R Martín-Hernandez, J Días, P García-Palencia, M Matabuena, A Juarranz, L Barrios, A Meana, A Nanetti, M Higes (2012). The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology* 14(4): 845–859
- [156] I Muñoz, A Cepero, MA Pinto, R Martín-Hernández, M Higes, P De la Rúa (2014) Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. *Infection, Genetics and Evolution* 23: 161–168
- [157] GE Sarlo (2011). I Seminario Apícola de la Provincia de Talagante” Chile.
- [158] S Erler, RFA Moritz (2016). Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). *Apidologie* 47(3): 389-411.
- [159] P Neumann, NL Carreck (2010). Honey bee colony loss. *Journal of Apicultural Research* 49: 1–6
- [160] DL Cox-Foster, S Conlan, EC Holmes, G Palacios, JD Evans, NA Moran, PL Quan, T Briese, M Hornig, DM Geiser, V Martinson, D vanEngelsdorp, AL Kalkstein, A Drysdale, J Hui, J Zhai, L Cui, SK Hutchison, JF Simons, M Egholm, JS Pettis, WI Lipkin (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(5848): 283–287
- [161]. M Higes, R Martín-Hernandez, E Garrido-Bailon, AV Gonzalez-Porto, P García-Palencia, A Meana, MJD Nozal, R Mayo, JL Bernal (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Report* 1(2): 110–113.

- [162] D Naug, A Gibbs (2009). Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40(6): 595–599.
- [163] V Doublet, ME Natsopoulou, L Zschiesche, RJ Paxton (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
- [164] D vanEngelsdorp, JD Evans, C Saegerman, C Mullin, E Haubruge, BK Nguyen, M Frazier, J Frazier, D Cox-Foster, Y Chen, R Underwood, DR Tarpy, JS Pettis (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 4(8): e6481.
- [165] HL Holt, CM Grozinger (2016). Approaches and Challenges to Managing *Nosema* (Microspora: Nosematidae) Parasites in Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of Economic Entomology*, 109(4): 1487–1503
- [166] M Higes, A Meana, C Bartolomé, C Botías, R Martín-Hernandez (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Report* 5(1): 17–29
- [167] X Araneda, M Cumian, D Morales (2015). Distribution, epidemiological characteristics and control methods of the pathogen *Nosema ceranae* Fries in honey bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Archivos de Medicina Veterinaria* 47: 129–138.
- [168] WT Wilson, RA Nunamaker (1983) The incidence of *Nosema apis* in honey bees in Mexico. *Bee World* 64(3): 132-136.
- [169] BE Traver, RD Fell (2012). Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology* 110(3): 408–410.
- [170] YW Chen, WP Chung, CH Wang, LF Solter, WF Huang (2012). *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *Journal of Invertebrate Pathology*. 111(3): 264–267
- [171] B Furgala RA Hyser (1969). Minnesota *Nosema* survey. *American Bee Journal* 109: 460-461.
- [172] OIE (2018). Nosemosis de las abejas melíferas. En: Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2018. Vol 2. 6th ed. OIE Biological Standards Commission, Paris, France..
- [173] M Sota, M Bacci (2004) Capítulo 2.2.4. Manual de procedimientos. Enfermedades de las abejas. http://www.inta.gov.ar/chubut/info/documentos/apicultura/api_manual_r.htm (acceso 8/02/2018).
- [174] KM Doull (1965) The effects of time of day and method of sampling on the determination of *Nosema* disease in bee hives. *Journal of Invertebrate Pathology* 7(1): 1-4.
- [175] AAM El-Shemy, RS Pickard (1989) *Nosema apis* Zander infection levels in honey bees of known age. *Journal of Apicultural Research* 28(2): 101-106.
- [176] JCM L'arrive (1963). Comparison of composite versus individual bee sampling for *Nosema apis* Zander. *Journal Insect Pathology* 5: 434-439.
- [177] I Fries, G Ekbohm, E Villumstad (1984). *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *Journal of Apicultural Research*, 23(2): 102-105.
- [178] I Fries, A Aarhus, H Hansen, S Korpela (1991). Comparison of diagnostic methods for detection of low infestation levels of *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental Applied Acarology* 10(3-4): 279- 287.

- [179] AM Murilhas (2002). *Varroa destructor* infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in a Mediterranean climate. *Apidologie* 33(3): 271-281.
- [180] M Del Hoyo, G. Rodriguez 1997. Protocolos de Laboratorio de Sanidad Apícola. En: Boletín PROAPI, pp 27.
- [181] GD Morison, EP Jeffree, L Murray, MD Allen (1956). Acarine and Nosema disease of honeybees in Britain, 1925–1947. *Bulletin of Entomological Research*, 46(4): 733–759.
- [182] EC Mussen, B Furgala, RA Hyser (1974). Enzootic levels of Nosema disease in the continental United States. *American Bee Journal*, 115(2):48-50.
- [183] E Oertel (1964). Nosema disease in the Baton Rouge area. *Glean Bee Culture*, 92 (7): 427-430.
- [184] I Fries (1993). *Nosema apis* - A parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74(1): 5–19.
- [185] TR Copley, SH Jabari (2012) Honey glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1): 15-24.
- [186] S Gisder, V Schüler, LL Horchler, D Groth, E Genersch (2017). Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(301): 1-14.
- [187] E Özgör, E Güzerin, N Keskin (2015). Determination and comparison of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in terms of geographic and climatic factors. *Hacettepe Journal of Biology Chemistry*, 43(1): 9-15.
- [188] B Mohammadian, S Bokaie, M Moharrami, S Nabian, M Forsi (2018) Distribution of *Nosema* spp. in climatic regions of Iran. *Veterinary Research Forum* 9 (3): 259 – 263
- [189] R Martín-Hernández, C Bartolomé, N Chejanovsky, Y Le Conte, A Dalmon, C Dussaubat, PGarcía-Palencia, A Meana, MA Pinto, V Soroker, M Higes (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20(4): 1302–1329.
- [190]. [192]. 199 GE Mulholland, BE Traver, NG Johnson, RD Fell (2012). Individual Variability of *Nosema ceranae* Infections in *Apis mellifera* Colonies. *Insects* 3(4): 1143-1155
- [191] L Bailey (1968). The measurement and interrelationships of infections with *Nosema apis* and *Malpighamoeba mellificae* of honey-bee populations. *Journal of Invertebrate Pathology* 12 175-179
- [192] BD Fingler, WT Nash, TI Szabo (1982) A comparison of two techniques for the measurement of *Nosema* disease in honey bee colonies wintered in Alberta, Canada. *American Bee Journal*, 122 369-371.
- [193] M Higes, P García-Palencia, R Martín-Hernández, A Meana (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia) *Journal of Invertebrate Pathology* 94(3): 211–217.
- [194] RS Cornman, YP Chen, MC Schatz, C Street, Y Zhao, B Desany, M Egholm, S Hutchison, JS Pettis, WI Lipkin, JD Evanns (2009). Genomic analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honeybees. *PLoS Pathogens* 5(6): e1000466.
- [195] SC Lee, N Corradi, S Doan, FS Dietrich, PJ Keeling, J Heitman, (2010) Evolution of the sex-related locus and genomic features shared in microsporidia and fungi. *PLoS One* 5:e10539.

- [196] T Gomez-Moracho, C Bartolomé, X Bello, R Martín-Hernandez, M Higes, X Maside. 2015b. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infection, Genetics and Evolution* 31: 87–94.
- [197] NH Barton (2010) Mutation and the evolution of recombination. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 365(1544):1281-94.
- [198] X Maside, T Gómez-Moracho, L Jara, R Martín-Hernández, P De la Rúa, M Higes, C. Bartolomé (2015). Population Genetics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*: One Host (*Apis mellifera*) and Two Different Histories. *PLoS ONE* 10(12): e0145609.
- [199] S Fenoy, C Rueda, M Higes, R Martín-Hernandez, C del Aguila (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* 75(21): 6886–6889.
- [200] R Martín-Hernandez, A Meana, P Garcia-Palencia, P Marin, C Botias, E Garrido-Bailon, L Barrios, M Higes (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(8): 2554–2557
- [201] JG Sánchez Collado, M Higes, L Barrio, R Martín-Hernández (2014) Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitology Research* 113: 1695–1701.
- [202] K Bollan, JD Hothersall, C Moffat, J Durkacz, N Saranzewa, G Wright, N Raine, F Highet, C Connolly (2013). The microsporidian parasites *Nosema ceranae* and *Nosema apis* are widespread in honeybee (*Apis mellifera*) colonies across Scotland. *Parasitology Research* 112(2): 751–759.
- [203] AL Szalanski, J Whitaker, AD Tripodi, P Cappy (2013). Prevalence of *Nosema* from Managed Honey Bee Colonies in South Dakota and New York. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 29(1): 99–104.
- [204] AL Szalanski, AD Tripodi, CE Trammel (2014). Molecular Detection of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* from Southwestern and South Central USA Feral Africanized and European Honey Bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Florida Entomologist* 97(2): 585–589
- [205] R Martín-Hernández, A Meana, L Prieto, A Martínez Salvador, E Garrido-Bailón, M Higes (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(20): 6331-6338.
- [206] M Yoshiyama, K Kimura (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 91-96.
- [207] ME Natsopoulou, DP McMahon, V Doublet, J Bryden, RJ Paxton (2015). Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1798), 20141896–20141896.
- [218] E Guzman-Novoa, L Eccles, Y Calvete, J Mcgowan, PG Kelly, A Correa-Benitez (2010). *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie* 41: 443–450.
- [209] B Emsen, E Guzman-Novoa, M Hamiduzzaman, L Eccles, B Lacey, R Ruiz-Perez, M Nasr (2015). Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitology Research* 115(1): 175–181.
- [210] J Ravoet, J Maharramov, I Meeus, L De Smet, T Wenseleers, G Smagghe, DC de Graaf (2013). Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE* 8: e72443.

- [211] S Medici, GE Sarlo, M Porrini, M Braunstein, MJ Eguaras (2012). Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. *Parasitology Research*. 110(2): 859-864
- [212] EW Teixeira, IG Dos Santos, A Sattler, D Message, M Alves, MF Martins, MI Grassi-Sella, TM Francoy (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than 3 decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3): 250-254.
- [213] M Porrini, PM Garrido, LP Porrini, P Fernandez Iriarte, J Paz, M Eguaras. (2018). Extensión espacio-temporal de *Nosema* spp (Microsporidia; Nosematidae) em apiarios productivos de Argentina. XIII Congreso de Apicultura Latinoamericana. Montevideo, Uruguay
- [214] A Molineri, A Giacobino, A Pacini, N Bulacio Cagnolo, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, L Zago, A Aignasse, H Pietronave, G Rodríguez, P Crisanti, MA Palacio, M Signorini (2018) Environment and Varroa destructor management as determinant of colony losses in apiaries under temperate and subtropical climate. *Journal of Apicultural Research* 57: 551-564.
- [215] HG Hall, DR Smith (1991) Distinguishing African and European honey bee matriline using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 4548-4552.
- [216] F Ruttner (1988). Biogeography and taxonomy of honey bees. Ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 291.
- [217] MC Arias, WS Sheppard (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 557–566.
- [218] I Miguel, M Baylac M Iriondo, C Manzano, L Garnery, A Estonba (2010) Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie* 42: 150–161
- [219] M Agra, S Lanzavecchia, C Conte, P Corva, J Cladera, M Palacio (2014). Determinación del origen de colonias de *Apis mellifera* en Argentina mediante marcadores moleculares. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura 2014. FILAPI. Misiones, Argentina.
- [220] CW Whitfield, SK Behura, SH Berlocher, AG Clark, JS Johnston, WS Sheppard, DR Smith, AV Suarez, D Weaver, NDTsutsui (2007). Thrice Out of Africa: Ancient and Recent Expansions of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Science* 314: 642-645.
- [221] AH Abrahamovich, O Atela, P De la Rúa, J Galián (2007) Assessment of the mitochondrial origin of honey bees from Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 46(3): 191-194.
- [222] HG Hall, DR Smith (1991). Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(10): 4548-4552 .
- [223] A Wallberg, F Han, G Wellhagen, B Dahle, M Kawata, N Haddad, ZL Simões, MH Allsop, I Kandemir, P De la Rúa, CW Pirk, MT Webster (2014). A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, 46(10):1081–1088.
- [224] D Moher, S Hopewell, KL Schulz, V Montori, PC Gøtzsche, PJ Devereaux, D Elbourne, M Egger, DG Altaman (2010). CONSORT 2010. Explanation and Elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c869.
- [225] RH Crozier, YC Crozier (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics Society of America*, 133: 97–117.

- [226] JA Lobo Segura (2000). Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. *Genetics and Molecular Biology*, 23(2): 317-322.
- [227] C Conte, S Lanzavecchia, M Agra, P Corva, J Cladera J, M Palacio (2008). Descripción de nuevas variantes haplotípicas en poblaciones de *Apis mellifera* en Argentina. IX Simposio Iberoamericano Sobre Conservación Y Utilización De Recursos Zoogenéticos. Mar Del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- [228] JA Di Rienzo, M Balzarini, L González, F Casanoves, M Tablada. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> (acceso 10.11.2018).
- [229] QGIS - Geographic Information System - (version 2.18.0). <https://www.qgis.org/en/site>. (acceso 10.11.2018).
- [230] R Martín-Hernandez, C Botias, EG Bailon, A Martínez-Salvador, L Prieto, A Meana, M Higes (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: Coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology*. 14(8): 2127–2138.
- [231] E Guzmán-Novoa, AC Benítez, LG Espinosa Montaña, G Guzmán Novoa (2011) Colonization, impact and control of Africanized honey bees in Mexico. *Veterinaria Mexico* 42(2):149-178.
- [232]. JC Bravao, V Carbonell, JT Valdebenito, C Figueroa, CE Valdovinos, R Martín-Hernández, M Higes, C Delporte (2014) Identification of *Nosema ceranae* in the Valparaíso District, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 46(3):487-491.
- [233] GR Williams, D Shutler, KL Burgher-MacLellan, REL Rogers (2014). Infra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. PLoS ONE 9: e99465.
- [234] MO Milbrath, T van Tran, WF Huang, L Solter, DR Tarpy, F Lawrence, ZY Huang (2015). Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 125: 9–15.
- [235] SJ Martin, LM Medina, (2004) Africanized honeybees have unique tolerance to Varroa mites. *Trends of Parasitology* 20, 112-114
- [236] RA Calderón, LA Sanchez, O Yañez, N Fallas (2008). Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research* 47(4): 328–329.
- [237] R Vandame, MA Palacio (2010). Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? *Apidologie* 41(3): 243-255.
- [238] ML Winston, SJ Katz (1981). Longevity of cross-fostered honeybee workers of European and Africanized races. *Canadian Journal of Zoology*. 59(8) 1571–1575
- [239] ML Winston, SJ Katz (1982) Foraging differences between cross-fostered honeybee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 10(2): 125-129.
- [240] GR Williams, MA Sampson, D Shutler, RE Rogers (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.
- [241] LA Malone, HS Gatehouse, EL Tregidga (2001) Effects of Time, Temperature, and Honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a Parasite of the Honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 77(4): 258–268

- [242] C Dussaubat, JL Brunet, M Higes, JK Colbourne, J Lopez, JH Choi, R Martín-Hernandez, C Botias, M Cousin, C McDonnell, M Bonnet, LP Belzunces, RFA Moritz, Y Le Conte, C Alaux (2012). Gut pathology and responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7(5): e37017.
- [243] C Invernizzi, E Santos, E Garcia, G Daners, R Di Landro, A Saadoun, C Cabrera (2011). Sanitary and nutritional characterization of honey bees colonies in Eucalyptus grandis plantations. *Archivos de Zootecnia* 60(232):1303-1314.
- [244] I Fries, S Camazine (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* 32: 199-214.
- [245] TE Murray, M Kuhlmann, SG Potts (2009). Conservation ecology of bees: populations, species and communities. *Apidologie* 40(3):211-236.
- [246] D vanEngelsdorp, MD Maixner (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 80-95.
- [247] C Kremen, NM Williams, MA Aizen, B Gemmill-Herren, G LeBuhn, R Minckley, L Packer, SG Potts, T Roulston, I Steffan-Dewenter, DP Vázquez, R Winfree, L Adams, EE Crone, SS Greenleaf, H Timothy, TH Keitt, AM Klein, J Regetz, TH Rickett (2007). Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letter* 10: 299–314.
- [248] D De Jong, RA Morse. GC Eickwort (1982). Mite pests of honey bees. *Annual Review of Entomology* 27(1): 229- 252.
- [249] JA Marcangeli (2000). Aplicación de una nueva técnica para determinar los niveles de infección de *Varroa jacobsoni* en colmenas de *Apis mellifera*. *Natura Neotropicalis* 31 (12): 81-85.
- [250] Bulacio Cagnolo N. 2011. Manejo Integrado de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colonias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en el centro oeste de la provincia de Santa Fe. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- [251] S Chowdhury, M Sandberg, GE Themudo, AK Ersboll (2012). Risk factors for *Campylobacter* infection in Danish broiler chickens. *Poultry Science*, 91(10): 2701–2709.
- [252] Kuldorff, M. (2014). SaTScan User Guide for version 9.3 [Adobe Digital Editions version]. <http://www.satscan.org>. (acceso 10.11.2018).
- [253] G Sepulveda, M Pinedo (1992). Curva anual de esporulación de *Nosema apis* en la zona agroclimática de Chillán. Tesis Med. Veterinario. Facultad de Ciencias Agronómicas, Veterinarias y Forestales, Universidad de Concepción (Chile), pp 59.
- [254] SSJ Winkler (2013). Identificación de especies de *Nosema* spp. en colonias de *Apis mellifera* en cuatro zonas geográficas de Chile, mediante técnica de reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas, Veterinarias y Forestales, Universidad de Concepción (Chile), pp 64.
- [255] CR Archer, CWW Pirk, GA Wright, SA Nicolson (2014). Nutrition affects survival in African honeybees exposed to interacting stressors. *Functional Ecology* 28(4): 913–923.
- [256] E Genersch, W von der Ohe, H Kaatz, A Schroeder, C Otten, R Buchler, S Berg, W Ritter, W Muhlen, S Gisder, M Meixner, G Liebig, P Rosenkranz (2010). The German bee monitoring project: A

- long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41, 332–352.
- [257] C Little, D Shutler, G Williams (2016). Associations among *Nosema* spp. fungi, *Varroa destructor* mites, and chemical treatments in honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 54(4): 378-385.
- [258] F Mariani, M Maggi, M Porrini, S Fuselli, G Caraballo, C Brasesco, C Barrios, J Principal, M Eguaras, M. (2012). Parasitic interactions between *Nosema* spp. and *Varroa destructor* in *Apis mellifera* colonies. *Zootecnia Tropical*, 30(1): 81–90.
- [259] X Yang, DL Cox-Foster, (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.
- [260] KR Neupane, RB Thapa (2005). Alternative to off-season sugar supplement feeding of honeybees. *J. Inst. Agric. Anim. Sci.* 26: 77-81.
- [261] DL Anderson, IJ East (2008). The latest buzz about colony collapse disorder. *Science* 319: 724–725.
- [262] M Ribiere, V Olivier, P Blanchard, F Schurr, O Celle, P Drajnudel, JP Faucon, R Thiery, MP Chauzat (2008). The collapse of bee colonies: the CCD case (“Colony collapse disorder”) and the IAPV virus (Israeli acute paralysis virus). *Virologie* 12: 319–322.
- [263] GV Amdam, SC Seehuu (2006). Order, disorder, death: lessons from a superorganism. *Advances in Cancer Research* 95: 31–60.
- [264] PG Gregory, JD Evans, T Rinderer, L De Guzman (2005). Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science* 5: 7-11.
- [265] Giacobino, A Molineri, NV Bulacio-Cagnolo, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, G Masciangelo, H Pietronave, A Pacini, C Salto, M Signorini (2016). Queen replacement: the key to prevent winter colony losses in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 55(4): 335–341.
- [266] Y Le Conte, M Ellis, W Ritter (2010). *Varroa* mites and honey bee health: Can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3), 353–363.
- [267] KV Lee, N Steinhauer, K Rennich, ME Wilson, DR Tarpy, DM Caron, R Robyn KS Delaplane, K Baylis, EJ Lengerich, J Pettis, JA Skinner, JT Wilkes, R Sagili,... D vanEngelsdorp (2015). A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46(3), 292–305.
- [268] A Jacques, M Laurent, EPILOBEE Consortium, M Ribière-Chabert, M Saussac, S Bougeard, GE Budge, PI Hendriks, MP Chauzat(2017). A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLoS One*, 12(3), 1–17.
- [269] A Meana, M Llorens-Picher, A Euba, JL Bernal, J Bernal, M Garcia-Chao, T Dagnac, JA Castro-Hermida, AV González-Porto, M Higes, RMartín-Hernández (2017). Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1): e0501.
- [270] M Maggi, K Antúnez, C Invernizzi, P Aldea, M Vargas, P Negri, C Brasesco, D De Jong, D Message, EW Teixeira, J Principal, C Barrios, S Ruffinengo, R Rodríguez Da Silva, M Eguaras (2016). Honeybee health in South America. *Apidologie* 47(6):835-854.

- [271]. F Requier, GK Andersson, FJ Oddi, N Garcia, LA Garibaldi (2018). Perspectives from the survey of honey bee colony losses during 2015–2016 in Argentina. *Bee World*, 95(1):9-12.
- [272] K Antunez, C Invernizzi, Y Mendoza, D VanEngelsdorp, P Zunino (2016). Honey bee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, 48, 364–370.
- [273] F Requier, K Antúnez, CL Morales, P Aldea Sánchez, D Castilhos, PM Garrido, A Giacobino, FJ Reynaldi, JM Rosso Londoño, E Santos, LA Garibaldi (2018). Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*, pp.1-6.
- [274] F Requier, JF Odoux, M Henry, V Bretagnolle, (2017). The carry-over effects of pollen shortage decrease the survival of honeybee colonies in farmlands. *Journal of Applied Ecology*, 54(4): 1161-1170
- [275] SG Potts, JC Biesmeijer, C Kremen, P Neumann, O Schweiger, WE Kunin (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 345–353.
- [276] GR Williams, K Head, KL Burgher-MacLellan (2010). Parasitic mites and Microsporidians in managed western honey bee colonies on the island of Newfoundland, Canada. *The Canadian Entomologist*, 142(6): 584-588.
- [277] JS Pettis, D vanEngelsdorp, J Johnson, G Dively. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Naturwissenschaften* 99(2): 153–158.
- [278] NA Steinhauer, K Rennich, ME Wilson, DM Caron, EJ Lengerich, JS Pettis, R Rose, JA Skinner, DR Tapy, JT Wilkes, D vanEngelsdorp & for the Bee Informed Partnership (2014). A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership, *Journal of Apicultural Research*, 53(1): 1-18
- [279] AC Pacini, A Mira, AI Molineri, A Giacobino, N Bulacio Cagnolo, A Aignasse, L Zago, M Izaguirre, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, H Pietronave R Russo, A Scanapiecco, S Lanzavecchia, L Schnittger, ML Signorini (2016). Distribution and prevalence of Nosema apis and N. ceranae in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141, 34 –37.
- [280] A Giacobino, AI Molineri, N Bulacio-Cagnolo, J Merke, E Orellano, E Bertozzi, E., G Masciangelo, H Pietronave, ML Signorini (2015). Risk factors associated with failures of Varroa treatments in honey bee colonies without broodless period. *Apidologie*, 46(5), 573–582.
- [281] D Khoury, A Barron, M Myerscough (2013). Modelling Food and Population Dynamics in Honey Bee Colonies. *PLoS ONE* 8(5): e59084
- [282] R Bahreini, RW Currie (2015). The influence of Nosema (Microspora: Nosematidae) infection on honey bee (Hymenoptera: Apidae) defense against Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 57–65.
- [283] Retschnig, G Williams, A Schneeberger, P Neumann (2017). Cold Ambient Temperature Promotes Nosema spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*) *Insects* 8, 20
- [284] T Gómez-Moracho, X Maside, R Martín-Hernández, M Higes, C Bartolomé (2014). High levels of genetic diversity in Nosema ceranae within Apis mellifera colonies. *Parasitology* 141: 475–481.
- [285] J Stevanovic, Z Stanimirovic, E Genersch, SR Kovacevic, J Ljubenkovic, M Radakovic, N Aleksic, N. (2011) Dominance of Nosema ceranae in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42: 49–58.
- [286] C Invernizzi, C Abud, IH Tomasco, J Harriet, G Ramallo, J Campá, et al. (2009) Presence of Nosema ceranae in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 101: 150–153.

- [287] J Martinez, G Leal, P Conget (2012) *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol Res* 111: 601-607.
- [288] V Soroker, A Hetzroni, B Yakobson, D David, A David, H Voet, et al. (2011) Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie* 42: 192–199.
- [289] I Fries, F Feng, A da Silva, SB Slemenda, NJ Pieniasek (1996) *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* 32: 356–365.
- [290] V Gamboa, J Ravoet, M Brunain, G Smagghe, I Meeus, J Figueroa, et al. (2015) Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. *J Invertebr Pathol* 129: 36–39.
- [291] S Plischuk, CE Lange, (2016) *Bombus brasiliensis* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) infected with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Rev Bras Entomol* 1–5.
- [292] P Graystock, K Yates, B Darvill, D Goulson, OH William (2013) Emerging dangers : deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *J Invertebr Pathol* 114: 114-119.
- [293] F Hatjina, G Tsoktouridis, M Bouga, L Charistos, V Evangelou, D Avtzis, et al. (2011) Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *J Invertebr Pathol* 108: 131–134.
- [294] B Oğuz, E Karapinar, E, Dinçer, MS Değer (2017) Molecular detection of *Nosema* spp. and black queen-cell virus in honeybees in Van Province, Turkey. *Turkish J Vet Anim Sci* 41: 221–227
- [295] R Martín-Hernandez, C Bartolome, N Chejanovsky, Y Le Conte, A Dalmon, C Dussaubat, A Meana, MA Pinto, V Soroker, M Higes (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* : a 12 years post-detection perspective: *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. *Environmental Microbiology* 20(4): 1302–1329.
- [296] V Chaimanee, N Warrit, P Chantawannakul (2010) Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *J Invertebr Pathol* 105: 207–210.
- [297] J Li, W Chen, J Wu, W Peng, J An, PSchmid-Hempel, R Schmid-Hempel (2012) Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus* spp.) from China. *Int J Parasitol* 42: 49–61.
- [298] N Arbulo, K Antúnez, S Salvarrey, E Santos, B Branchiccela, R Martín-Hernández, et al. (2015) High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *J Invertebr Pathol* 130: 165–168.
- [299] J Ravoet, L De Smet, I Meeus, G Smagghe, T Wenseleers, DC de Graaf (2014) Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees. *J Invertebr Pathol* 122: 55–58.
- [300] K Antúnez, M Anido, B Branchiccela, J Harriet, J Campa, C Invernizzi, E Santos, M Higes, R Martín-Hernández, P Zunino (2015). Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*: 70: 522-533.
- [301] Y Mendoza, S Diaz-Cetti, G Ramallo, E Santos, M Porrini, C Invernizzi (2016). *Nosema ceranae* winter Control: study of the effectiveness of different fumagillin treatments and consequences on the strength of honey bees colonies. *Journal of Economic Entomology* 110: 1-5.

ANEXOS

Anexo 1: Encuestas realizadas a técnicos apícolas, para armar curvas de floración.

Nombre:

Departamento:

Apiarios asesorados (incluyendo n° de colmenas):

1. Marcar con una X en cada mes, el nivel (de 1 a 10) de flujo de néctar correspondiente a la región donde desempeña su trabajo.

Escala de Flujo	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												

2. Marcar con una X en cada mes, el nivel (de 1 a 10) de flujo de polen correspondiente a la región donde desempeña su trabajo.

Escala de Flujo	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
1												
2												
3												
4												

5												
6												
7												
8												
9												
10												

3. ¿A partir de qué mes (de ser posible especificar con más detalle) considera Ud. que comienza el desarrollo del nido de cría en la zona donde desempeña su trabajo?

4. ¿En qué período (quincena y mes) identifica Ud. Un mayor ingreso de néctar en la zona donde desempeña su trabajo?

5. ¿En qué período (quincena y mes) finaliza la cosecha de miel en la zona donde desempeña su trabajo?

6. ¿En qué período (quincena y mes) comienzan los tratamientos pos-cosecha acaricidas en la zona donde desempeña su trabajo?

7. ¿Realiza normalmente tratamientos contra Varroa durante la época Invernal? Si es así, ¿En qué período (quincena y mes) lo aplica y que producto utiliza?

Anexo 2: Encuesta post-cosecha 2015, realizada a productores apícolas que participaron del monitoreo.

Fecha: Nombre del Apiario: **Número de colmenas:**
RENSPA: Ubicación geográfica (georreferenciada): Antigüedad en
la Actividad (años):

1- La actividad apícola representa para usted:

- a- Su principal fuente de ingresos económicos
- b- Una actividad económica secundaria
- c- Otra. Especificar: vinculación laboral

2- ¿Qué suplemento de polen utiliza?

- a- Polen natural comercial b-Polen natural recolectado por usted c- Torta comercial
- d-Realiza su propia torta e-No suplementa

¿Agrega polivitamínico?

- a- Sí b- No

Suplementa:

- a- Todos los años b- Cuando es necesario

3- ¿Alimenta las colmenas con jarabe de azúcar o algún otro suplemento energético?

- a- Sí b- No

En caso afirmativo, especificar ¿qué alimento utiliza?

- a- Jarabe de azúcar b- Azúcar, sin diluir c- Sólo jarabe de maíz de alta fructosa d- Miel e- otra

¿En qué estación del año lo aplica?

- a- Otoño b- Primavera c- Otro (especificar):.....

Alimenta:

- a- Todos los años b- Cuando es necesario

4- ¿Realiza recambio de reinas?

- a- Sí b- No

¿Cada cuántos años recambia la reina en cada una de sus colmenas?

- a- Todos los años b- Cada dos años c- Más de dos años d- No recambia

5- ¿Cómo realiza la multiplicación de su apiario? (Marcar todas las opciones correctas)

- a- Núcleos en primavera
b- División de colmenas en otoño
c- Paquetes en primavera

6- ¿Realiza recambio anual de cuadros?

- a- Menos de 3 c./colmena b- 3 c./colmena c- más de 3 c./colmena d- No realiza

7- ¿Desinfecta el material inerte cuando vuelve del apiario?

- a- Sí b- No

En caso afirmativo ¿Cómo realiza la desinfección?

- a- Fundido b- Flameado c- Lava con lavandina d- Lo deja en el apiario

8- Ubicación del apiario

- a- Debajo de árboles de hojas perennes (las hojas permanecen en el árbol durante todo el año)
b- Debajo de árboles de hojas caducas (las hojas caen del árbol en alguna estación del año)
c- Sol directo, sin árboles cubriendo el apiario.

9- ¿Realizan bloqueo de cámara de cría en otoño?

- a- Jarabe 2:1 b- Jarabe 1:1 c- No

10- ¿Practica trashumancia?

- a- Sí b- No

En el caso afirmativo ¿Hacia dónde y cuál es el mes de salida de las colmenas?

¿Cuál es el mes de regreso de las colmenas?

¿Qué porcentaje del apiario traslada?

¿Realiza monitoreo y tratamiento acaricida luego del traslado de las colmenas?

a- Si b- No

11- ¿Utiliza poncho?

a- Sí b- No

12- ¿Aplica tratamiento para Varroosis en el otoño, posterior a la cosecha de miel?

a- Si b- No

13- ¿Realiza muestreos Pre-tratamiento y Pos-tratamiento (prueba del frasco)?

a- Sólo Pre-tratamiento b-Sólo Pos-tratamiento c-Ambos d-Ninguno

14- Complete el siguiente cuadro:

	Otoño 2012	Primavera 2012	Otoño 2013	Primavera 2013	Otoño 2014
Producto acaricida utilizado					
Marca comercial					
¿Cómo lo aplicó?					
¿Tuvo Problemas de eficacia?(SI/NO)					
¿Fue necesario un segundo tratamiento?					
¿Con qué producto acaricida recuró?					
¿Cómo lo aplicó?					

15- ¿Aplicó tratamiento acaricida a la salida de la invernada 2014?

a- Si b- No

¿Qué producto utilizó?

a- Ac. Oxálico b- Ac. Fórmico c- Amitraz d- Timol e- Flumetrina
 f- Fluvalinato g- Coumaphos

Indique el nombre comercial del producto aplicado y el modo de aplicación.

¿Cuándo fue realizada la aplicación? (colocar fecha)

Observaciones: finalizado el tratamiento del timol

16- ¿Realizó tratamientos contra Nosema?

Si: No:

En caso afirmativo, ¿realizó un muestreo previo?

Si: No:

¿Qué niveles de esporas de Nosema había previo al tratamiento?

a- Menos de 350.000 b-Entre 350.000 y 1 millón c- Más de 1 millón

¿Qué producto comercial utilizó y cuándo fue realizada la aplicación? (colocar fecha)

Observaciones:

17- ¿Existen apiarios cercanos?

a- Si b-No

¿Cuántos?

¿A qué distancia se encuentran cada uno de ellos?

Sobre estos apiarios ¿Qué cantidad de colmenas hay por apiarios?

18- Mortalidad invernal de colmenas (porcentaje) durante los últimos tres años:

2012:

2013:

2014:

Indique las causas aparentes o factores asociados que atribuye a las pérdidas

Causas/Año	2012	2013	2014
Heladas			
Sequías			
Inundaciones			
Granizadas			
Intoxicación por aplicaciones de plaguicidas			
Fuentes de agua contaminada			
Hormigas			
Hambre			
Enfermedades			

Problemas de Reina			
No Se			
Otros			

19- ¿Cuál fue la producción promedio de miel/colmena de los últimos 3 años?

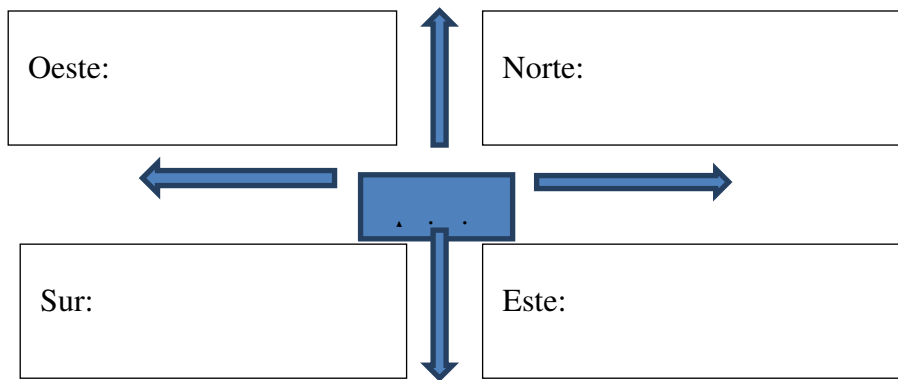
2011-2012

2012-2013

2013-2014

20- ¿Qué tipo de vegetación, pastura, cultivos observa rodeando algunos metros su apiario?

Predominio de palma algarrobo algarrobillo



Anexo3: Encuesta otoño 2015, realizada a productores apícolas que participaron del monitoreo

Fecha: **N° de colmenas:**

Identificación del apiario: **Técnico:**

1- Completar el siguiente cuadro

	Otoño 2015
Producto acaricida utilizado	
Marca comercial	
¿Cuándo aplicó?	
¿Cómo lo aplicó?	
¿Tuvo Problemas de eficacia?(SI/NO)	

2- ¿Realizó tratamientos contra Nosema?

Si: No:

En caso afirmativo, ¿realizó un muestreo previo?

Si: No:

¿Qué niveles de esporas de Nosema había previo al tratamiento?

b- Menos de 350.000 b-Entre 350.000 y 1 millón c- Más de 1 millón

¿Qué producto utilizó y cuándo fue realizada la aplicación? (colocar fecha)

Observaciones:

Anexo 4: Encuesta inicio de temporada (Primavera 2015) realizada a productores apícolas que participaron del monitoreo

Fecha: _____ **N° de colmenas (sin contar los núcleos agregados):** _____

Identificación del apiario: _____

Técnico: _____

1- Completar el siguiente cuadro

	Fin internada 2015
Producto acaricida utilizado	
Marca comercial	
¿Cuándo aplicó?	
¿Cómo lo aplicó?	
¿Tuvo Problemas de eficacia?(SI/NO)	

2- ¿Qué productos acaricidas utilizó a la salida de la internada en los últimos 3 años?

Producto/Año	2012	2013	2014
Amitraz			
Coumaphos			
Flumetrina			
Fluvalinato			
Timol			
Oxálico			

3- ¿Realizó tratamientos contra Nosema?

Si: _____ No: _____

En caso afirmativo, ¿realizó un muestreo previo?

Si: _____ No: _____

¿Qué niveles de esporas de Nosema había previo al tratamiento?

c- Menos de 350.000 b-Entre 350.000 y 1 millón c-Mas de 1 millón

¿Qué producto utilizó y cuándo fue realizada la aplicación? (colocar fecha)

Observaciones:

4- ¿Qué producción promedio de miel (en kg. Por colmena) se registró en la temporada 2014 - 2015?

