

**Determinación de introgresión de genes
africanos en abejas melíferas (*Apis mellifera*)
de la República Argentina. Estudio de la
toxicidad frente a plaguicidas de uso agrícola
y resistencia a enfermedades**



Tesista: Lic. María Laura Genchi García

Directores: Dr. Claudio M. Bravi

Dr. Francisco J. Reynaldi

2025

FCN_yM

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Determinación de introgresión de genes africanos en abejas melíferas (*Apis mellifera*) de la República Argentina. Estudio de la toxicidad frente a plaguicidas de uso agrícola y resistencia a enfermedades



Tesista: Lic. María Laura Genchi García

Directores: Dr. Claudio M. Bravi

Dr. Francisco J. Reynaldi

2025

A Lidia Clara.
Mi mayor pilar y motor.

A María Belén.
Mi incansable compañera.

RESUMEN

La abeja melífera (*Apis mellifera* L.) no es una especie nativa de América, sin embargo la región alberga una gran diversidad de linajes. Los híbridos resultantes de los cruces entre subespecies, se han dispersado en la mayoría de los países del continente, generando poblaciones con adaptaciones particulares a cada región. Las condiciones climáticas y los factores ambientales han limitado la dispersión de las poblaciones de origen africano y de sus híbridos, hacia el norte y sur del continente. Sin embargo, han logrado distribuirse en la mayor parte de los países de Latinoamérica, y su presencia en Argentina no es una excepción.

Apis mellifera, desempeña un papel esencial en la agricultura moderna. Además de la producción de miel, las abejas proporcionan servicios ecosistémicos críticos, como la polinización, para una amplia gama de cultivos agrícolas de alto valor. Sin embargo, durante el último medio siglo las abejas se han visto sometidas a un estrés cada vez mayor, que ha resultado en tasas de mortalidad en aumento en todo el mundo. Las causas de esta elevada mortalidad aún no se han aclarado por completo. Cambios en el uso de la tierra, cultivos y prácticas agrícolas, nuevos plaguicidas y aplicaciones más extensas de agroquímicos, apicultura cada vez más intensiva y, la propagación y carga creciente de parásitos y patógenos, se han propuesto como principales factores que contribuyen al deterioro de la salud y a la mortalidad de las abejas a nivel mundial. Estudiar las causas de esta problemática multifactorial requiere enfoques holísticos que exploren cómo los factores de riesgo interactúan entre sí.

A partir de la hipótesis que propone que las diferencias genéticas entre las abejas de distintos linajes puede jugar un rol importante en la resistencia a enfermedades, del mismo modo que frente a la detoxificación o la capacidad de tolerar mayores cargas de agroquímicos en su organismo y, con el fin de evaluar la existencia de diferencias en la resistencia y/o tolerancia en las poblaciones de abejas de origen materno europeo y africano frente a parásitos, patógenos y agroquímicos de uso extensivo, se realizó la actualización tanto del origen materno de las poblaciones productivas de abejas de Argentina, como de su estado sanitario. Adicionalmente, se revisó el origen materno de las poblaciones de abejas existentes en el país en las diferentes regiones productivas que permitió no solo conocer la distribución de linajes maternos europeos y africanos sino actualizar los límites australes que el proceso de africanización de las poblaciones ha alcanzado en nuestro país, comparado con otros países de la región. Del mismo modo, se detectó y cuantificó tanto la presencia de los patógenos y co-infecciones más prevalentes en poblaciones de abejas de diferente linaje materno, como los niveles de toxicidad oral aguda en respuesta a agroquímicos.

ABSTRACT

The honey bee (*Apis mellifera* L.) is not a species native to the American continent, however the region is home to a great diversity of lineages. The hybrids resulting from crosses between subspecies have dispersed in

most countries, generating populations with particular adaptations to each region. Climatic conditions and environmental factors have limited the dispersion of populations of African origin as well as their hybrids, to the north and south of the continent. However, they have managed to be distributed in most Latin American countries, and their presence in Argentina is no exception.

Apis mellifera, plays an essential role in modern agriculture. In addition to honey production, bees provide critical ecosystem services, such as pollination for a wide range of high-value agricultural crops. However, over the past half-century bees have been under increasing stress, which has resulted in rising mortality rates around the world. The causes of this high mortality have not yet been fully clarified. Changes in land use, crops and agricultural practices, new pesticides and more extensive applications of agrochemicals, increasingly intensive beekeeping, and the increasing spread and load of parasites and pathogens have been proposed as major factors contributing to the decline of bee health and mortality worldwide. Studying the causes of this multifactorial problem requires holistic approaches that explore how risk factors interact with each other.

Based on the hypothesis that the genetic difference between bees of different lineages may play an important role in disease resistance, as well as in the face of detoxification or the ability to tolerate higher loads of agrochemicals in their body, and, in order to evaluate the existence of differences in resistance and/or tolerance in the populations of bees of European and African maternal origin against parasites, pathogens and pesticides for agricultural use, an update was made on both the maternal origin of the productive populations of bees in Argentina, as well as their health status. Additionally, the maternal origin of the bee populations existing in the country in the different productive regions was reviewed, which allowed not only to know the distribution of European and African maternal lineages but also to update the southern limits that the process of Africanization of populations has reached in our country, compared to other countries in the region. In the same way, the presence of the most prevalent pathogens and co-infections in bee populations of different maternal lineage was detected and quantified, as well as the levels of acute oral toxicity in response to agrochemicals.

ÍNDICE (interactivo)

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
Clasificación taxonómica y descripción sistemática de la especie	9
Caracterización de las poblaciones de <i>Apis mellifera</i>	9
Factores que afectan a las poblaciones de <i>Apis mellifera</i> y colapso de colonias	11
Abejas como recurso natural, productivo y cultural	15
CAPÍTULO 1: Determinación del origen materno de las poblaciones de abejas melíferas (<i>Apis mellifera</i> L.) en Argentina. Introgresión de genes y distribución geográfica de haplogrupos europeos y africanos.	19
Introducción	20
Materiales y Métodos	25
Resultados	30
Discusión	34
CAPÍTULO 2: Estado sanitario de las poblaciones de <i>A. mellifera</i> L. de Argentina. Detección de <i>Varroa destructor</i> , virus ARN de cadena positiva, <i>Vairimorpha</i> spp. (ex <i>Nosema</i> spp.), <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Melissococcus plutonius</i> , <i>Ascosphaera apis</i> y análisis de su prevalencia en las cinco regiones productivas argentinas.	41
Introducción	42
<i>Varroa destructor</i>	43
Virus ARN de cadena positiva	44
<i>Vairimorpha</i> spp. (= <i>Nosema</i> spp.)	47
<i>Ascosphaera apis</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> y <i>Melissococcus plutonius</i>	50
Materiales y Métodos	54
Detección y cuantificación de <i>Varroa</i>	55
Detección de virus ARN	56
Detección y cuantificación de niveles de infección por <i>Vairimorpha</i> spp.	57
Detección de bacterias y hongos	57
Resultados	59
Porcentaje de infestación por <i>Varroa</i>	59
Detección de virus ARN de cadena positiva	61
Detección y cuantificación de niveles de infección por <i>Vairimorpha</i> spp.	64
Detección de bacterias y hongos	65
Discusión	67
Infestación por <i>Varroa</i>	67
Presencia de virus ARN de cadena positiva	71
Infección por <i>Vairimorpha</i> spp.	75
Detección de bacterias y hongos	78
CAPÍTULO 3: Interacción entre las principales enfermedades presentes y los linajes maternos hallados en las poblaciones de <i>A. mellifera</i> L. de Argentina.	81
Introducción	82
Interacciones entre patógenos	82
Relación entre origen genético de las abejas y presencia de patógenos	85
Materiales y Métodos	88
Resultados	89
Discusión	94

Interacciones entre patógenos	94
Relación entre origen genético de las abejas y presencia de patógenos	96
CAPÍTULO 4: Análisis de la mortalidad de abejas adultas expuestas a agroquímicos a partir de ensayos de toxicidad oral aguda <i>in vitro</i> . Diferencias entre mitotipo europeo y africano.	
Introducción	103
Productos químicos sintéticos de uso en producción agrícola. Plaguicidas	104
La incidencia de los plaguicidas en el entorno apícola y en la salud de las abejas	104
Naturaleza química y efectos de los agroquímicos utilizados	107
Neonicotinoides (Thiamethoxam e Imidacloprid)	107
Organofosforados (Clorpirifós)	110
Herbicidas (Glifosato)	111
Materiales y Métodos	113
Tratamientos y cálculo de las dosis estudiadas	113
Diseño y preparación de las unidades experimentales. Enjaule de material vivo	113
Ensayos <i>in vitro</i>	115
Análisis estadísticos	116
Resultados	116
Comparación de los valores de mortalidad entre dosis empleadas y controles no tóxicos, para las 24, 48 y 72hs.	116
Comparación de los valores de mortalidad entre haplogrupos mitocondriales, para las 24, 48 y 72hs	120
Discusión	122
CONCLUSIONES	129
PERSPECTIVAS A FUTURO	132
BIBLIOGRAFÍA	134
AGRADECIMIENTOS	204

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Clasificación taxonómica y sistemática de la especie

La abeja melífera (*Apis mellifera* L. 1758), es un insecto perteneciente al Orden Hymenoptera, Familia Apidae. Desde la clasificación clásica realizada por Ruttner (1988), ha habido numerosos debates sobre el número de subespecies, su rango de distribución, taxonomía y origen, debido a la especificidad de la estructura de la población, las características de la biología y la resolución de los métodos de discriminación de subespecies (Tanascovick *et al.*, 2022). Sus características le permitieron ser la abeja con mayor distribución, encontrándose en todos los continentes (Verde, 2014), a excepción de la Antártida. Las historias evolutiva y biogeográfica son complejas y, detrás de ellas subyacen diferencias genéticas que contribuyen a conformar las diversas poblaciones alrededor del mundo (Dogantzis *et al.*, 2019). La especie se distribuía en su área geográfica nativa, posteriormente se produjeron múltiples oleadas de colonización y eventos glaciales, que provocaron el surgimiento de 33 subespecies reconocidas actualmente (Ilyasov *et al.*, 2020). Tanto los estudios biogeográficos, como morfométricos y moleculares han mostrado evidencia de su evolución en, por lo menos, cuatro linajes evolutivos principales (Ruttner *et al.*, 1978; Ruttner, 1988; Garnery *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1996; Franck *et al.*, 2000, 2001; De la Rúa *et al.*, 2005; Kandemir *et al.*, 2006; Whitfield *et al.*, 2006; Cánovas *et al.*, 2008; Wallberg *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Cridland *et al.*, 2017), aunque recientemente, se ha propuesto la existencia de nuevos linajes (Alburaki *et al.*, 2013; Harpur *et al.*, 2014; Cridland *et al.*, 2017; Techer *et al.*, 2017; Espregueira Themudo *et al.*, 2020; Dogantzis *et al.*, 2021).

2. Caracterización de las poblaciones de *A. mellifera*

Apis mellifera se caracteriza por formar parte de colonias integradas por miles de individuos que presentan una organización eusocial, con cuidado de la cría, superposición de generaciones y división en castas (Seeley, 1995)(Figura 1). Es un insecto holometábolo, con 4 estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. En el estadio de larva se alimenta y crece, la celda en la que se encuentra es operculada, cambia de posición elongándose, y se suceden rápidos cambios dentro de la cutícula. En la pupa se reorganiza el *bauplan*, y se suceden cambios morfológicos que van a dar lugar al adulto (Snodgrass, 1956). La cantidad de días que transcurren entre cada estadio de desarrollo varía según la casta a la que pertenecen (Figura 2), siendo un factor especialmente importante para el desarrollo de cada una de ellas, aunque también lo es para el progreso de enfermedades de la cría y el establecimiento de los parásitos que han adaptado su ciclo de vida al de las abejas.

Cada colonia funciona como un superorganismo (Wilson, 1971a; Seeley, 1989), que presenta castas diferenciadas funcional, morfológica y cariotípicamente (Barchuk *et al.*, 2007)(Figura 2).



Figura 1 – Abeja melífera (*Apis mellifera* L.) y apiario con colonias productivas (colmenas).



Figura 2 – Imagen ilustrativa del desarrollo de *Apis mellifera* L., graficado en abejas obreras. Diferenciación morfológica de las castas en adultos. Tabla de días aproximados para cada estadio de cría, por casta.

La reina es una hembra diploide, con función reproductiva, que se aparea con un número variable de zánganos, comportamiento conocido como ‘poliandria’, que permite considerar a la colonia como una superfamilia, con una madre común, compuesta por tantas subfamilias como zánganos se hayan apareado con la reina y, es la que posee mayor expectativa de vida en la colonia (Castelli *et al.*, 2021). Los zánganos, por su parte, son cientos de machos haploides, con función reproductiva; mientras que la mayor parte de la colonia se encuentra formada por abejas obreras, hembras estériles, diploides, que cumplen diversas funciones a lo largo de su ontogenia. En este sentido, la división de trabajo de las abejas obreras se basa, principalmente, en su edad (polietismo etario o temporal), de este modo, un mismo individuo cumple a lo largo de su vida múltiples tareas que comienzan dentro de la colonia y finalizan fuera de ella (Seeley, 1982; Winston, 1987), organizando su funcionamiento (Robinson, 1992; Seeley, 1995; Anderson & Ratnieks 1999)(Figura 3). La determinación de esas tareas está regulada por cambios endócrinos que modifican fisiológicamente a la abeja (Robinson, 1992) y, que son desencadenados por los estímulos que reciben del ambiente social (Winston, 1979).

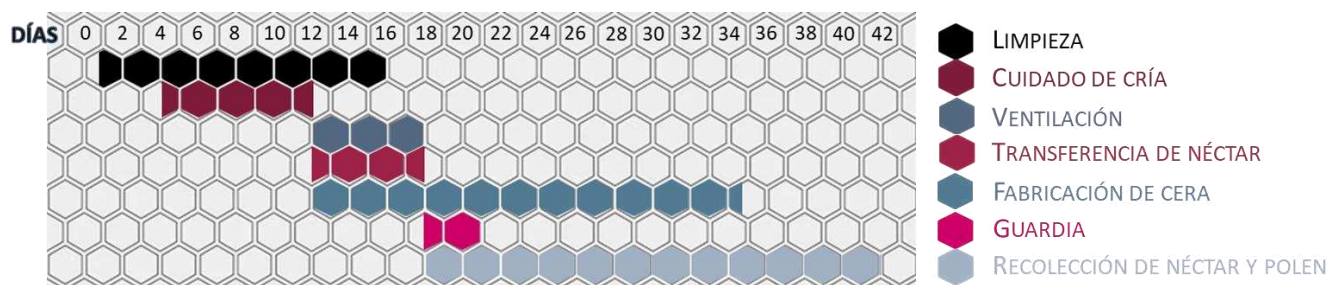


Figura 3 – Ilustración del polietismo temporal de las obreras de *Apis mellifera* L., en días posteriores a la eclosión del adulto (según Grosso, 2018 y Mengoni Goñalons, 2017).

Durante los primeros días de vida adulta, la obrera limpia celdas de las que recientemente emergió la cría o que presentan cría enferma. Se alimenta de polen, favoreciendo la activación de las glándulas hipofaríngeas

que se hacen funcionales a partir de los 3 días de edad y, les permiten formar el alimento para la cría. Las funciones de nodriza también incluyen el cuidado de la reina, operculación de celdas, limpieza y alimentación de otras obreras. Estas actividades se desarrollan durante 10 a 12 días, posteriormente abandonan el área de cría y cumplen sus funciones, principalmente en la periferia del nido, transportando desde la entrada hacia el interior, procesando y almacenando alimento. Además, ayudan a proteger la entrada de la colmena, ventilan, y continúan acicalando y alimentando a otras obreras. Al llegar a mediana edad, activan las glándulas cereras para construir panales y finalmente, a partir de los 20 días y hasta el final de la vida, desarrollan tareas fuera de la colmena como recolectoras de néctar, polen, agua y resina (Winston, 1979; Seeley, 1995; Grosso, 2018)(Figura 3).

Si bien esta secuencia general de actividades es fija, existe una gran variación entre los individuos respecto del esfuerzo invertido en las diferentes actividades dentro de cada conjunto de tareas (Beshers & Fewell, 2001; Walton & Toth, 2016), ya que puede ocurrir que una obrera nunca emprenda una determinada actividad, mientras que otra se especialice en ella por varios días (Robinson *et al.*, 1984; Wray *et al.*, 2011). Gran parte de este comportamiento está determinado por la variabilidad genética subyacente entre obreras pertenecientes a una misma cohorte. Así, la poliandria provee interacciones genéticas beneficiosas entre subfamilias (Castelli *et al.*, 2021). Los individuos altamente especializados son más eficientes, redundando en un aumento del *fitness* de la colmena (Wray *et al.*, 2011). Del mismo modo, la diversidad genética en la colonia contribuye a reducir el impacto negativo sobre la supervivencia, prevenir la endogamia y aumentar las chances de sobrevivir a enfermedades (Mattila & Seeley, 2007; Simone-Finstrom *et al.*, 2016). Por otra parte, la habilidad de la reina para adquirir, acumular y mantener el esperma viable es la clave para su longevidad (Baer *et al.*, 2016) y, también, para la sostenibilidad de la colonia (Tarpy *et al.*, 2013), ya que la muerte de la reina precede, generalmente, a su pérdida (vanEngelsdorp *et al.*, 2013).

3. Factores que afectan a las poblaciones de *Apis mellifera* y colapso de colonias

Las poblaciones de abejas, tanto silvestres como productivas, afrontan numerosos desafíos. En las últimas décadas han experimentado junto con otros polinizadores una tendencia a la disminución en número de individuos (Potts *et al.*, 2010, 2016; Hallmann *et al.*, 2017; McDermott, 2021), registrándose altas tasas de mortalidad a nivel mundial (Meixner *et al.*, 2010; Mikheyev *et al.*, 2015; Maggi *et al.*, 2016; Requier *et al.*, 2018, 2024) con reportes de pérdidas anuales significativas en colonias manejadas (Neumann & Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2016). La pérdida de polinizadores amenaza no sólo a la biodiversidad, sino también a la producción agrícola, ya que numerosas especies de cultivos dependen de ellos para la reproducción (Simon-Delso *et al.*, 2014; Watson & Stallins, 2016), así como a la propia actividad apícola (Ellis *et al.*, 2010; Dainat *et al.*, 2012; Genchi García *et al.*, 2019). Se han registrado numerosos casos de pérdidas masivas de colmenas reportados en América, Asia, Europa y Oceanía (Oldroyd & Fewell, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2017; Ellis *et al.*, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Johnson *et al.* 2010; Dainat *et al.*, 2012; van der Zee *et al.*, 2012; Farooqui, 2013; Clermont *et al.*, 2014; Staveley *et al.*, 2014; Meana *et al.*, 2017; Antúnez *et al.*, 2017;

Brodtschneider *et al.*, 2018; Gray *et al.*, 2019, 2020, 2022), aunque la signología y las posibles causas son diferentes en cada caso (Stokstad, 2007). En América Latina, la Sociedad Latinoamericana para la Investigación en Abejas (SOLATINA), estimó pérdidas entre el 13% y 53%, entre las que Argentina escaló a un 34% anual para el período 2016-2017 (Requier & Antúnez, 2020) y alrededor del 20% para 2017-2018 (Requier *et al.*, 2024). Los primeros estadios del colapso de las colmenas usualmente son irreconocibles, debido al exceso de población que actúa como *buffer* frente a las pérdidas repentinas en la fuerza de trabajo (Seeley, 1995; Barron, 2015). Los cambios súbitos son difíciles de detectar y esto lleva a que las intervenciones de los apicultores ocurran de manera tardía cuando las colmenas están muy débiles o han muerto. Particularmente, cuando las pérdidas se caracterizan por la ausencia de abejas adultas en colonias con gran cantidad de cría operculada y reservas de alimento (Cox-Foster *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009, 2010), el fenómeno es conocido como Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (SDC); sin embargo, no todos los casos de pérdidas de colonias son atribuibles a este síndrome.

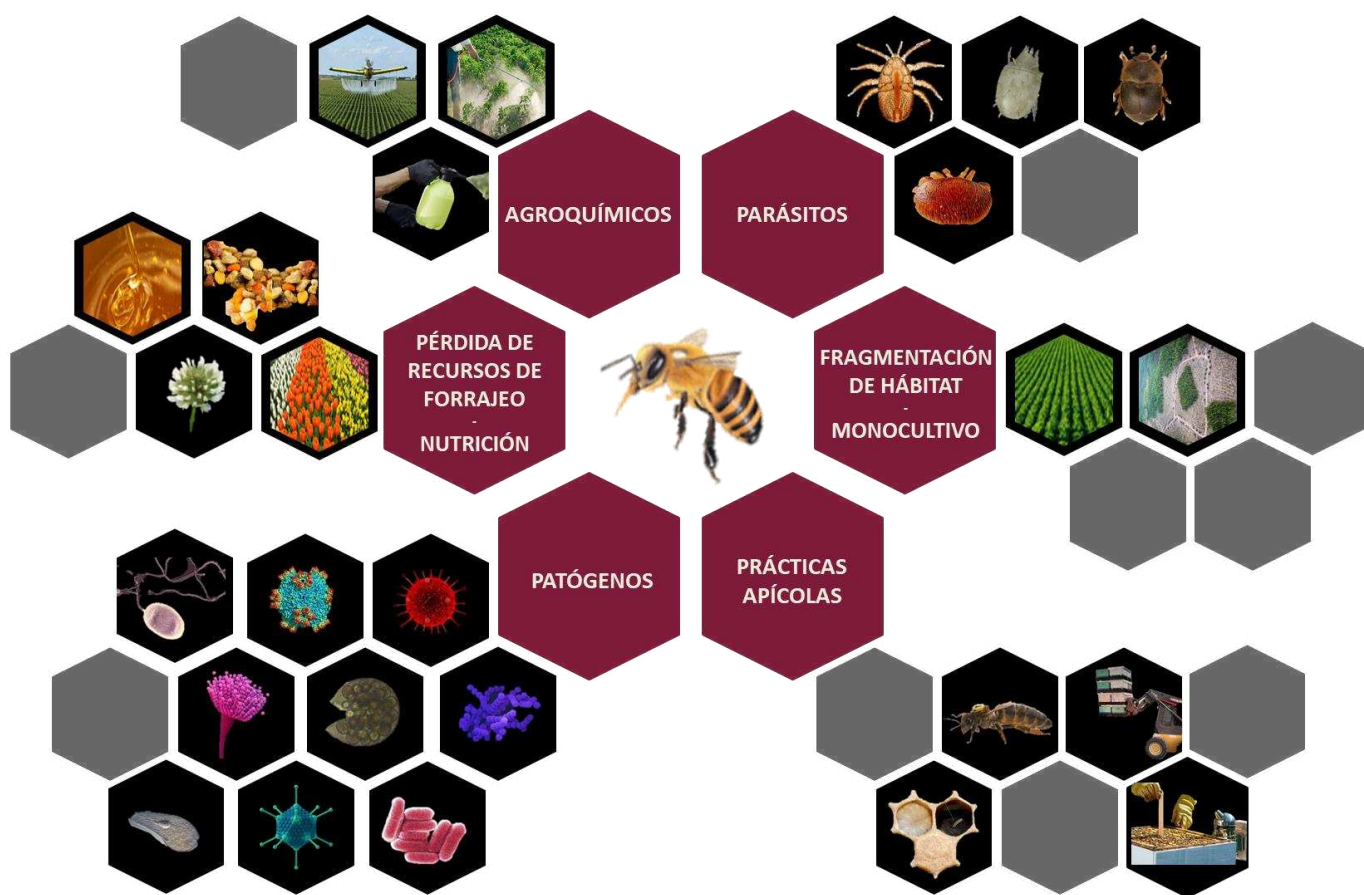


Figura 4 – Principales factores que afectan de manera negativa a las poblaciones de *Apis mellifera* y que han sido relacionado a las pérdidas de colonias a nivel global.

En este contexto, el estado sanitario de las abejas ha sido resaltado (Hassler *et al.*, 2021) y las causas que subyacen a este fenómeno, son objeto de estudio a nivel global. Entre ellas, han sido postulados patógenos, parásitos y las enfermedades que estos producen; las prácticas apícolas; la longevidad de la reina; los

agroquímicos; la fragmentación y degradación de hábitats; el monocultivo; la pérdida de recursos de forrajeo; la disminución de plantas con flor y la nutrición, entre las más importantes a las que se enfrentan, principalmente durante las tareas de recolección y armado del nido (Evans & Schwarz, 2011; Higes *et al.*, 2013; vanEngelsdorp, 2013; Doublet *et al.*, 2015; Goulson *et al.*, 2015; Forfert *et al.*, 2015, 2017; Chaimanee, 2016; Çakmak & Sevençakmak, 2016; Brandt, 2017; Fünfhaus *et al.*, 2018; McMenamin & Flenniken, 2018; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Steinhauer *et al.*, 2018; Grozinger & Flenniken, 2019; Cornelissen *et al.*, 2019; Hristov *et al.*, 2020; Milone & Tarpy 2021; Jamal *et al.*, 2021; de Jongh *et al.*, 2022; Piot *et al.*, 2022; Mayak *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2023a)(Figura 4).

Sin embargo, los estresores no actúan generalmente de forma independiente y con frecuencia los efectos aditivos o sinérgicos de las interacciones, afectan la salud de las colonias, que en general están asociados a los descensos poblacionales (Johnson *et al.*, 2010; Staveley *et al.*, 2014; O'Neal *et al.*, 2018; Siviter *et al.*, 2021; Goulson & Nicholls, 2022). Actualmente, existe un gran consenso en la idea de la interacción entre múltiples factores (Ratnieks *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010; Dainat *et al.*, 2012; Goulson *et al.*, 2015; Meana *et al.*, 2017; Genchi García *et al.*, 2019), aunque la suma de factores que interviene en cada proceso es propio de cada región ecológica. Aun así, y pese a su importante rol en los ecosistemas (Preston *et al.*, 2016; Piot *et al.*, 2022), una de las principales causas que ha sido relacionada a este proceso a nivel mundial es el aumento en la ocurrencia de patógenos (vanEngelsdorp *et al.*, 2010; Cornman *et al.*, 2012), que puede estar determinado por factores como el tiempo de coevolución entre patógeno y hospedador; las características genéticas, la fisiología y la respuesta inmune del hospedador; la ruta de transmisión y factores ambientales (Rigaud *et al.*, 2010; Britton & Jane White, 2021). Por otra parte, la colonia se caracteriza por presentar condiciones particulares de temperatura y humedad, como diversos nichos ecológicos, atractivos para agentes infecciosos (Lannutti *et al.*, 2022), que hacen a las poblaciones potencialmente susceptibles frente a una gran variedad de ellos (Pasho *et al.*, 2021).

Como organismo eusocial, los estresores que influyen en la salud individual de las abejas pueden contribuir a generar un mayor costo en el *fitness* de la colonia (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Aunque las abejas reinas contribuyan monopolizando la reproducción (Winston, 1987), la alta densidad de individuos favorece el contacto, aumentando la transmisión de patógenos (Schmid-Hempel, 2005, 2009; Koch & Schmid-Hempel, 2011). En contraparte, el comportamiento social aumenta el *fitness* individual, incluyendo el cuidado cooperativo de la cría, la defensa contra el enemigo y la capacidad de modificar el microambiente de la colonia (Moritz & Southwick, 1992; Wilson-Rich *et al.*, 2009). Sin embargo, en epidemiología, frecuentemente se considera a la colonia como unidad básica de estudio, sugiriendo que las cargas de patógenos y parásitos son uniformes entre individuos.

Por otra parte, el cambio climático afecta a la flora, la fauna y sus interacciones, incluida la fenología de la floración, las recompensas florales, el comportamiento de las abejas y las interacciones entre los polinizadores, lo que da como resultado comunidades nuevas y ecosistemas alterados (Keeler *et al.*, 2021;

Vercelli *et al.*, 2021). En un contexto natural, las abejas forrajeras o pecoreadoras no suelen obtener néctar de una sola fuente, sino que recolectan el alimento dentro de un parche floral. Así, cada abeja debe visitar un cierto número de flores, antes de poder retornar a la colmena para descargar lo recolectado (Wainseboim, 2003). Por lo tanto, la disponibilidad de recursos florales es un factor clave para la preservación de la salud de las comunidades de abejas, ya que de la calidad nutricional y cantidad del polen y néctar dependerá la fortaleza de las colonias y su capacidad para enfrentar diferentes estresores (Brodschneider & Crailsheim, 2010). Sin embargo, el consumo de polen y néctar contaminados presenta un alto riesgo de transmisión de patógenos (Singh *et al.*, 2010; Alger *et al.*, 2019; Yañez *et al.*, 2020; Burnham *et al.* 2021; Dalmon *et al.*, 2021) y de transporte de agroquímicos, o metabolitos derivados de ellos, hacia las colmenas (Peterson *et al.*, 2022). Particularmente en el proceso de recolección, es importante el tiempo que la abeja permanece tanto en la fuente de alimento, como en la colmena (Wainseboim, 2003). Una vez que la abeja retorna, descarga el néctar recolectado a través de la transferencia ‘boca a boca’, denominada trofalaxia (Korst & Velthuis, 1982), que generalmente se realiza en no más de dos o tres eventos por estadía en la colmena (De Marco & Farina, 2001). Pero existe una gran cantidad de contactos cortos (Farina & Wainseboim, 2010) que están involucrados en procesos de transferencia de información quimiosensorial (Ratnieks & Anderson, 1999; De Marco & Farina 2001). Los contactos trofalácticos son indispensables para la colonia, sin embargo, contribuyen a la dispersión de enfermedades y al ingreso de agroquímicos en ella.

Paralelamente, el avance de la frontera agrícola ha intensificado la utilización de agroquímicos, los que ocasionaron profundas transformaciones en la configuración regional (Campana *et al.*, 2019), y representan un potencial impacto negativo en las poblaciones de abejas, afectándolas tanto de manera directa como indirecta. Se ha demostrado que pueden causar déficit en el aprendizaje y la memoria (Decourtye *et al.*, 2005; Karahan *et al.*, 2015), que producen, a largo plazo, la pérdida de colonias e incluso de apiarios completos (Desneux *et al.*, 2007; Maini & Aggarwal, 2010). En la última década se han realizado numerosos análisis referidos al impacto potencial de los agroquímicos sobre las abejas y las prohibiciones de utilización en otras regiones del mundo (Blake, 2018), con énfasis en aquellos implicados en el entorno agrícola. Sin embargo, los planes de gestión desarrollados para fomentar poblaciones de abejas sanas, en general están dirigidos a mejorar la nutrición y el éxito reproductivo, en lugar de aliviar los riesgos de exposición a agroquímicos y patógenos (Comisión Europea, 2017).

A pesar de las amenazas que enfrentan las colonias de abejas, han desarrollado numerosos niveles de defensa e inmunidad que les confieren mecanismos especiales para defenderse permitiéndoles mejorar la supervivencia (Evans & Pettis, 2005). La evolución de la eusocialidad junto con la elaborada organización social, ha favorecido la selección del comportamiento higiénico como un rasgo importante para controlar la transmisión y propagación de enfermedades dentro de las colonias (Cremer *et al.*, 2007). Entre ellos, se encuentra el comportamiento de acicalamiento o *grooming* (Bailey, 1955; Chen *et al.*, 2008; Martin-Hernandez *et al.*, 2018; Traynor *et al.*, 2020), particularmente estudiado en Argentina y Uruguay (Russo *et al.*, 2020b;

Peck, 2021). Adicionalmente, algunas poblaciones de *A. mellifera* exhiben rasgos de resistencia o tolerancia, algunos de ellos con base genética, que le permiten coexistir con patógenos durante períodos prolongados sin requerir ningún tratamiento (Locke & Fries, 2011; Strauss *et al.*, 2016), contribuyendo a reducir la incidencia de enfermedades.

Por otra parte, la pérdida de diversidad genética en las poblaciones es también considerada causal de disminución de las colonias (Oldroyd & Fewell, 2007; Meixner, 2010; Sheppard, 2012), ya que es fundamental para resistir perturbaciones a corto plazo, debidas a cambios ambientales o presencia de patógenos, que le permiten evolucionar a mayor escala en respuesta a ellos (Tarpy, 2003; Oldroyd & Fewell, 2007; Frankham *et al.*, 2010). La introducción de nuevas subespecies en las localmente adaptadas y el *stress* producido por los cambios ambientales son considerados como una potencial amenaza (Hirstov *et al.*, 2018). A escala global, la pérdida de colonias resultante de los desafíos previamente expuestos podría conducir a un declive masivo de la biodiversidad y de la producción agrícola, reflejándose en la pérdida de recursos alimentarios (Aizen *et al.*, 2009), situación que plantea la necesidad de realizar exhaustivos análisis (Steinhauer *et al.*, 2018; Hristov *et al.*, 2020).

4. Abejas como recurso natural, productivo y cultural

Las abejas melíferas han sido desde el siglo XVII, tanto una gran invasión ecológica como un importante recurso productivo para la región. Pese a ser un organismo introducido, es un capital ecológico-económico



Figura 5 – Abejas como recurso económico. Imágenes de colmenas productivas y productos. De izquierda a derecha: Pretemporada - colmenas organizadas en sistema de pallets para práctica de trashumancia; en temporada - colmenas de primavera tardía con cuadros de miel; posttemporada - tambor de miel extractada en la cosecha y fraccionamiento para venta.

invaluable y de gran relevancia cultural. En ese sentido, es uno de los organismos fundamentales para el balance del ecosistema con gran relevancia en la producción global de alimentos, esencial en la agricultura moderna. Por otra parte, la dependencia de polinizadores que presentan los cultivos se encuentra en aumento (Aizen *et al.*, 2019; Garibaldi *et al.*, 2020). En este sentido, los servicios de

polinización mediada por animales benefician a más de tres cuartas partes de ellos (Porto *et al.*, 2020), mejorando la calidad y cantidad al ser realizados por insectos (Fijen *et al.*, 2018; Khalifa *et al.*, 2021). El rol de las abejas melíferas como polinizadores de cultivos es fundamental (Southwick & Southwick, 1992; Hünicken *et al.*, 2020), ya que alrededor del 77% de la producción agrícola destinada a alimentos depende de ellas

(Buchmann & Nabhan, 1996; Lanutti *et al.*, 2022), encabezando los servicios de polinización entre abejas solitarias y sociales, tanto en ecosistemas naturales como manejados a escala global y siendo, a su vez, considerada como uno de los polinizadores más importantes, debido al gran número de individuos por colonia (Garibaldi *et al.*, 2017).

Paralelamente, de la actividad desarrollada por las abejas, pueden obtenerse numerosos productos (Allen-Wardell *et al.*, 1998) como miel, jalea real, propóleos, polen y cera (Aizen & Harder, 2009), todos de gran importancia económica. Esta actividad, a su vez, provee beneficios económicos a apicultores y se encuentra íntimamente relacionada con importantes valores sociales y culturales. Es interesante destacar que, la comercialización y exportación de miel, que constituye un alimento natural con potenciales beneficios para la salud, se ha transformado en un elemento más de la economía para numerosos países del mundo (Lautenbach *et al.*, 2012; Potts *et al.*, 2016; Lanutti *et al.*, 2022).

La apicultura es una actividad muy extendida en Argentina, disitribuida en casi todo el territorio (Ferrari *et al.*, 2011), reconocida como la más importante del hemisferio sur, y una de las más grandes a nivel mundial (Figura 5)(Blengino, 2014). Se caracteriza por su diversidad y dinamismo, y además ha recibido reconocimiento nacional e internacional, principalmente a partir de la producción y exportación de miel (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca - MAGyP, 2019) experimentando un gran crecimiento en el país a mediados de la década del 90. En la actualidad, los volúmenes estimados de producción de miel son cercanos al 6% del total mundial, con un promedio anual de 76.000 toneladas (División de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - FAOSTAT, 2020), de las cuales se exportan entre el 95% y 97%, principalmente a Estados Unidos, Alemania y Japón (Alimentos Argentinos, 2017; Servicio Nacional de Sanidad y Calidad

Agroalimentaria - SENASA, 2019). De esta manera, la Argentina se posiciona como uno de los mayores productores y exportadores de miel en el mundo (Sanchez *et al.*, 2018; Alimentos Argentinos, 2024). Consecuentemente, se desarrollan numerosos programas que aúnan esfuerzos públicos y privados con el propósito de apoyar a la actividad, incluyendo selección y cría de abejas.

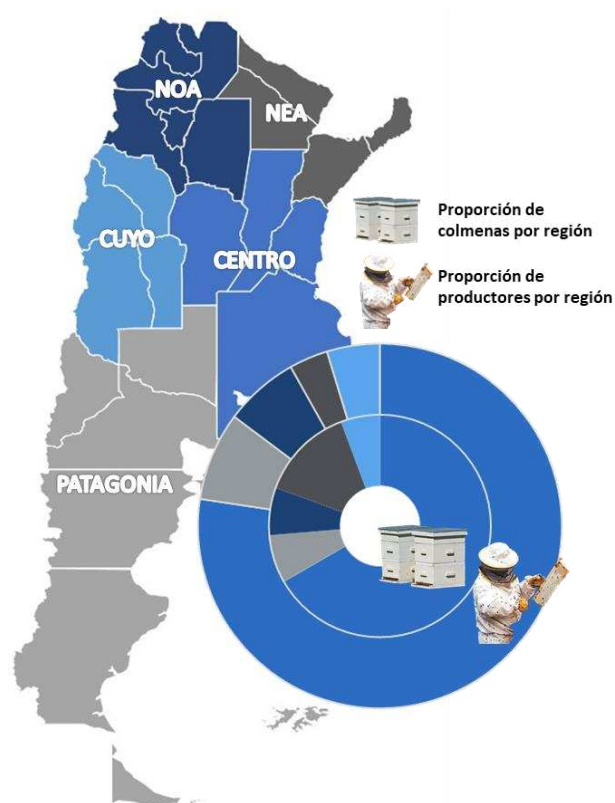


Figura 6 – Mapa de regiones productivas y distribución porcentual de colmenas y productores registrados en el país, discriminados por región. Los colores del gráfico se corresponden a los colores de las regiones en el mapa.

La República Argentina presenta un amplio rango de condiciones que posibilitan la producción, con 4.087.885 colmenas registradas y 20.413 productores (Registro Nacional de Productores Apícolas - RENAPA, 2023), lo que convierte a la actividad apícola en uno de los principales actores de las economías regionales de nuestro país. Se han determinado 5 zonas apícolas según el criterio propuesto por el Consejo Federal de Inversiones (CFI) en 2003, y modificado por CFI-INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) y SAGPyA (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca) en 2007, en relación a las regiones fitogeográficas (Figura 6): CENTRO, que incluye las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe; NOROESTE (NOA), comprendida por Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero y Catamarca; NORESTE (NEA), que abarca Formosa, Chaco, Misiones Y Corrientes; CUYO, integrada por La Rioja, San Juan, San Luis y Mendoza; y PATAGONIA, incluyendo las provincias de La Pampa, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz (Ferrari *et al.*, 2011). En este entramado regional se ha registrado la mayor concentración de productores y colmenas en la región CENTRO, dónde se ubican el 66,6% de los productores y el 80,7% de las colmenas, en particular, en la provincia de Buenos Aires, seguida por Entre Ríos y Santa Fe. Mientras que en la región PATAGONIA se ubican el 8,2% de colmenas y el 7% de productores del país, la región CUYO reúne un 4,9% de las colmenas y 5,7% de productores. En la zona de NEA se ubican un 3,6% y 13,7% de colmenas y productores, respectivamente. Y finalmente, la región NOA sólo reúne el 2,7% de las colmenas y el 6,9% de los productores registrados en el país (Figura 6). En este escenario regional, la mayor parte de los grandes apicultores practican la trashumancia (SENASA, 2019), con un traslado anual de alrededor de 1.000.000 de colmenas en busca de floraciones y/o para prestar servicios de polinización.

Cabe mencionar que la distribución de las poblaciones de *A. mellifera* en el territorio argentino ha sido influenciada tanto por las prácticas intensivas de trashumancia y las técnicas apícolas, como también por la compraventa de reinas y material vivo a escala transregional, sumado en las últimas décadas a la pérdida masiva de colonias.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del proyecto de tesis fue determinar tanto la presencia como la prevalencia de los patógenos más frecuentes en el país (*Varroa destructor*, *Vairimorpha* spp., virus ARN, *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*), y analizar los niveles de toxicidad oral aguda en respuesta a agroquímicos, en poblaciones de abejas de diferente linaje materno, con el fin de evaluar la existencia de diferencias entre poblaciones de origen materno europeo y africano.

Adicionalmente, se propuso actualizar tanto el origen materno de las poblaciones productivas de abejas de Argentina, como su estado sanitario y la distribución geográfica de los patógenos.

HIPÓTESIS

1. Las poblaciones de abejas melíferas de Argentina pertenecen a diversos haplogrupos correspondientes a diferentes orígenes maternos, cuya distribución varía latitudinalmente de acuerdo con la región geográfica, y el proceso de africanización se encuentra en constante avance hacia latitudes más australes, favorecido por los cambios climáticos.
2. Las poblaciones de abejas melíferas de Argentina albergan la presencia de numerosos patógenos cuya distribución e interacciones dependen principalmente de la naturaleza de los patógenos implicados y las características de la región en la que se encuentran.
3. Las poblaciones de abejas de linaje materno africano presentan una mayor resistencia o grado de tolerancia frente a las infecciones de patógenos respecto de las abejas de linaje europeo.
4. Existen variaciones en los mecanismos de resistencia, tolerancia y/o desintoxicación entre los distintos linajes maternos de *A. mellifera* que permiten afrontar los efectos producidos por los agroquímicos de manera diferencial.

CAPÍTULO 1

Determinación del origen materno de las poblaciones de
abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) en Argentina.
Introgresión de genes y distribución geográfica de
haplogrupos europeos y africanos

1. INTRODUCCIÓN

La abeja melífera, *Apis mellifera* L., es una especie nativa de África, Europa, y el oeste de Asia (Ruttner, 1988). Su origen ha sido intensamente debatido y numerosas hipótesis han sido propuestas. Wilson (1971a), Whitfield *et al.* (2006) y Cridland *et al.* (2017) propusieron un origen africano, mientras que Deodikar *et al.* (1958), Ruttner *et al.* (1978), Garnery *et al.* (1992), Tihelka *et al.* (2020), Han *et al.* (2012), Wallberg *et al.* (2014), Chen *et al.* (2016) y Dogantzis *et al.* (2021) hallaron sustento para la hipótesis que propone a Asia como lugar de origen y, más recientemente Carr (2023) propuso que la génesis de la especie está situada en Europa. Independientemente de su lugar de origen, la especie comprende alrededor de 33 subespecies descritas (Ruttner, 1988; Sheppard *et al.*, 1997, 2003; Engel, 1999; Ilyasov *et al.*, 2015, 2020; Tanaskovic *et al.*, 2021) que se encuentran en un amplio rango de ambientes en los que las mutaciones y la selección natural favorecen la adaptación a diversas condiciones, resultando en ecotipos bien adaptados (Ruttner, 1988; Stanimirovic *et al.*, 2005; Le Conte *et al.*, 2008; De la Rúa *et al.*, 2009; Meixner *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016). El aislamiento geográfico de las poblaciones de abejas, mediado por barreras naturales, favoreció la variación genética. En tal sentido, los estudios biogeográficos, morfométricos y moleculares han mostrado que la especie ha evolucionado en, por lo menos, cuatro ramas principales: C en el sudeste europeo, M en el noreste y oeste europeo, O en Medio Oriente y A presente en África y en la península ibérica (Ruttner *et al.*, 1978; Ruttner, 1988; Garnery *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1996; Franck *et al.*, 2000, 2001; De la Rúa *et al.*, 2005; Kandemir *et al.*, 2006; Whitfield *et al.*, 2006; Cánovas *et al.*, 2008; Wallberg *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Cridland *et al.*, 2017). Recientemente, la existencia de nuevos linajes ha sido propuesta, como el Y (Franck *et al.*, 2001; Espregueira Themudo *et al.*, 2020) correspondiente a las abejas de la península arábiga, genéticamente distintas de los linajes A y O (Harpur *et al.*, 2014, Cridland *et al.*, 2017), el linaje Z que comprende un grupo de abejas previamente reconocidas en el linaje O (Alburaki *et al.*, 2013), que también ha sido propuesto como un sublinaje del linaje A (Techer *et al.*, 2017) y el L y U para dos nuevas subespecies secuenciadas que forman *clusters* únicos (Dogantzis *et al.*, 2021). Su historia evolutiva y su biogeografía son tan complejas como interesantes, y la mejor manera de analizarlas radica en examinar las diferencias genéticas que contribuyen a conformar las diversas poblaciones de abejas alrededor del mundo (Dogantzis *et al.*, 2019).

Debido a la acción humana, esta especie de abejas se ha distribuido ampliamente en todo el mundo, fuera de su área nativa (Pirk *et al.*, 2017). Su expansión incluye, en un primer período, durante el siglo XVII, la introducción en América principalmente de colonias de los linajes M y C (Schneider *et al.*, 2004). Desde entonces las poblaciones de abejas europeas comenzaron a establecerse en el continente (Requier, 2020) y fueron seleccionadas según criterios de producción y mansedumbre (Kent *et al.*, 2011). A principios del siglo XIX, sucesivas introducciones de abejas de origen europeo de linaje M fueron documentadas, mientras que, para mediados del mismo siglo, la introducción del linaje C se tornó preponderante y las colonias

correspondientes a este origen, predilectas para la actividad productiva (Bierzychudek, 1979). Posteriormente, en 1956 en un intento por estudiar la adaptación a los climas tropicales y subtropicales, se introdujeron abejas de origen africano del linaje A (*A. m. scutellata*) (Kerr, 1967; Goncalvez, 1974; Michener, 1975; Dietz, 1982) (Figura 1.1). La introducción de esta nueva subespecie resultó en su dispersión en todo el continente, iniciando un complejo proceso de hibridación entre poblaciones europeas y africanas (Lobo Segura, 2000; Clarke *et al.*, 2002; Quezada-Euan *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2004; Moritz *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2005; Collet *et al.*, 2006; Kraus *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2007; Salamanca Groso, 2009; Guzman-Novoa *et al.*, 2011; Branchiccela *et al.*, 2014; Harpur *et al.*, 2015; Kono & Kohn, 2015; Dominguez-Ayala *et al.*, 2016; Rangel *et al.*, 2016) con proporción desigual de introgresión de genes nucleares y mitocondriales (Hall, 1990; Sheppard *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2001).

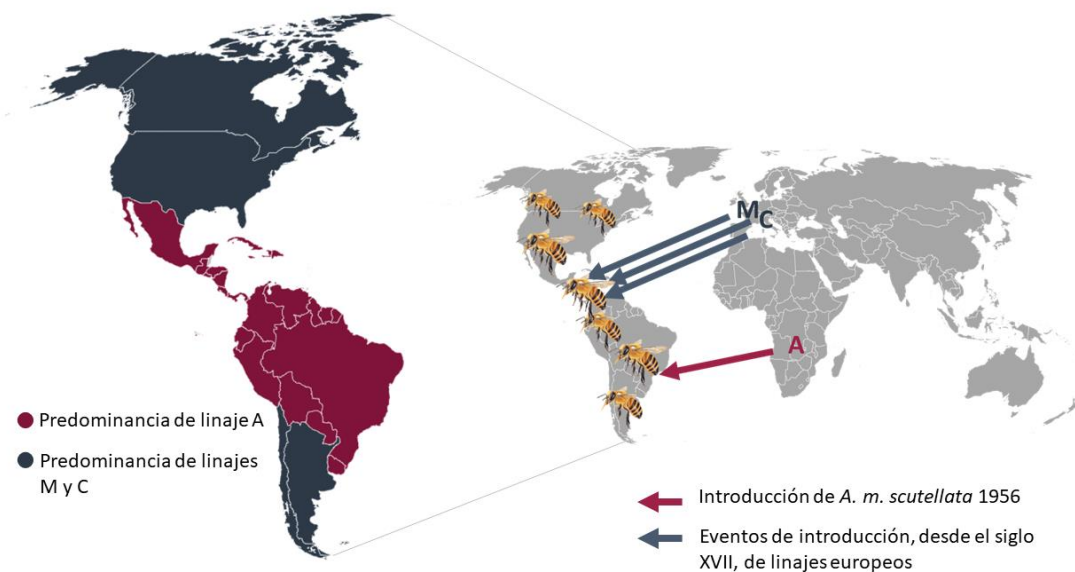


Figura 1.1 - Principales eventos de introducción de *A. mellifera* en el continente americano y distribución de linajes en América. Ubicación estimada de los linajes M, C y A en sus regiones nativas de distribución. Las flechas indican los eventos de introducción de la especie en el continente americano, en el que se puede observar la predominancia de poblaciones africanizadas y linajes maternos africanos o europeos, por país. Mapa realizado en base a los trabajos de Kerr (1967), De Santis & Cornejo (1968), Taylor (1977), Bierzychudek (1979), Buchmann (1982), Dietz (1982), Harper (1982), Dietz *et al.* (1985), Locke & Cobey (1986), Moffet *et al.* (1987), Kent (1988), Ruttner (1988), Lobo Segura (2000), Caron (2001), Clarke *et al.* (2001; 2002), Pérez-Castro *et al.* (2002), Quezada-Euan *et al.* (2003), Schneider *et al.* (2004), Pinto *et al.* (2005), Collet *et al.* (2006), Whitfield *et al.* (2006), Abrahamovich *et al.* (2007), Pinto *et al.* (2007), Kraus *et al.* (2007), Salamanca Groso (2009), Guzman-Novoa *et al.* (2011), Branchiccela *et al.* (2014), Harpur *et al.* (2015), Kono & Kohn (2015), Dominguez-Ayala *et al.* (2016), Rangel *et al.* (2016), Genchi García *et al.* (2018), Tibatá *et al.* (2018a), Acevedo-Gonzalez *et al.* (2019), Porrini *et al.* (2019), Tihelka *et al.* (2020), Dogantzis *et al.* (2021), Alburaki *et al.* (2022), Düttmann *et al.* (2022), Carr (2023).

Las características comportamentales y genéticas africanas han sido altamente preservadas durante su expansión e hibridación (Schneider *et al.*, 2004; Moritz *et al.*, 2005). Numerosos estudios sugieren que estas poblaciones se expandieron por migración materna (Taylor, 1988; Hall *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1991) y el proceso de africanización gradualmente reemplazó a las poblaciones europeas por aquellas de

características africanas (Dávila *et al.*, 1980; Lobo Segura, 2000; Collet *et al.*, 2006; Salamanca Grosso, 2009; Guzman Novoa *et al.*, 2011) predominando, en más de 20 países americanos (Guzman-Novoa *et al.*, 2011 – Figura 1.1) con límites probables de extensión propuestos para América del Norte (Kono *et al.*, 2015; Carpenter *et al.*, 2021) y América del Sur (Dietz *et al.*, 1985; Genchi García *et al.*, 2018; Porrini *et al.*, 2019) alrededor de los 35° de latitud Norte y Sur. La expansión de las abejas africanizadas en el continente americano en las últimas seis décadas es considerada una de las invasiones biológicas más eficientes (Pinto *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2006; Zárate *et al.*, 2022).

Las características de la historia de vida de las abejas evidencian una gran plasticidad y variabilidad genética que puede dar lugar a la selección de ciclos de desarrollo adaptados a nuevas condiciones ambientales (Le Conte *et al.*, 2008). El pool genético de las poblaciones de *A. mellifera* y el flujo de genes entre subespecies no solo evoluciona por selección natural, sino también gracias a las prácticas de los apicultores (Louveaux *et al.*, 1966) que han fomentado el transporte de abejas a través del mundo y la selección artificial (Harpur *et al.*, 2012; Leclercq *et al.*, 2018).

Históricamente, las abejas han sido empleadas para la polinización y producción de miel (Bloch *et al.*, 2010; Kritsky, 2017), aunque recientemente, en los siglos XVII y XVIII, ha sido posible mantener grandes colonias con técnicas que dieron lugar a la apicultura moderna (Phillips, 1918). La domesticación de *A. mellifera* está relacionada con su productividad, debido a que la especie ha evolucionado sobre la característica de reserva de miel (Requier, 2020). Existen variaciones sustanciales en comportamiento, morfología y caracteres moleculares entre las diversas subespecies de abejas, incluso en una misma rama evolutiva. Particularmente, las abejas del linaje A son seleccionadas negativamente para su utilización, tanto comercial como a menor escala, por su gran comportamiento defensivo y por la propensión al abandono del nido, mientras que el linaje C es particularmente favorecido en la selección de colonias para apicultura comercial debido a su naturaleza dócil, poco agresiva para su manejo y la característica de acopio de alimento (Ruttner, 1988; Zárate, 2022).

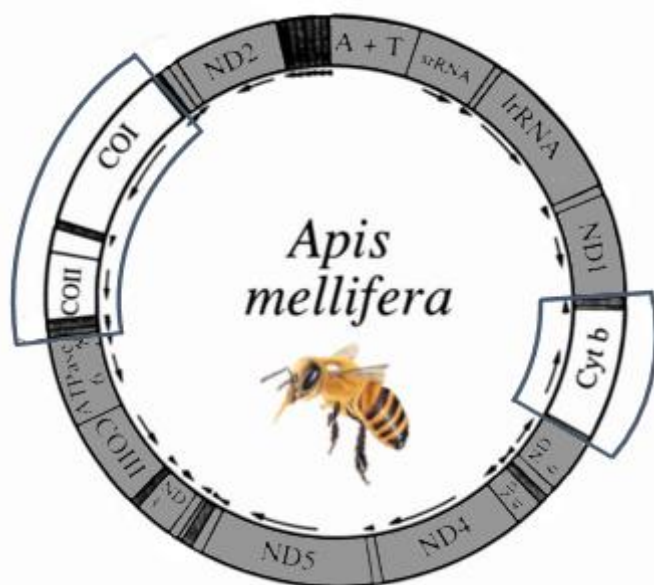
Existen más de 4.000.000 de colmenas registradas para actividades productivas en Argentina, la mayoría de las cuales se encuentran en la región CENTRO, comprendida por las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba (RENAPA, 2023). En un escenario de predominancia de haplogrupos africanos y establecimiento de la africanización en el continente americano (Lobo Segura, 2000; Quezada-Euan *et al.*, 2003; Collet *et al.*, 2006; Salamanca Grosó, 2009; Guzman-Novoa *et al.*, 2011; Branchiccela *et al.*, 2014; Dominguez-Ayala *et al.*, 2016), las poblaciones argentinas mantienen un acervo genético principalmente europeo (Dietz *et al.*, 1985; Abrahamovich *et al.*, 2007; Genchi García *et al.*, 2018; Agra *et al.*, 2018; Porrini *et al.*, 2019 – Figura 1.1) aunque el proceso de introgresión de genes africanos puede evidenciarse principalmente en las poblaciones del norte del país.

De acuerdo con lo postulado por De Santis & Cornejo (1968), los híbridos africanizados producto del cruce entre poblaciones de abejas europeas y africanas estaban presentes en el norte de Misiones para 1965 y, para 1966 el proceso había alcanzado la mitad de la provincia. En 1967, las provincias de Formosa, Corrientes y,

probablemente Chaco, fueron invadidas, como Santa Fe y la región norte de Santiago del Estero en 1968. La africanización llegó a la provincia de Córdoba para 1970 (Kerr *et al.*, 1982) y, hacia 2005-2006, se reportaron colonias productivas de origen africano en el norte de Buenos Aires (Abrahamovich *et al.*, 2007). Para 2013-2014, el proceso de africanización parecía mantenerse relativamente estable en la provincia, al igual que el límite sur de expansión del proceso (Genchi García *et al.*, 2018), en línea con las observaciones de Pinto *et al.* (2004), quienes reportaron la disminución de los haplogrupos mitocondriales pertenecientes a linajes europeos en un 30% durante los primeros 4 años posteriores a la introducción de las abejas africanas, permaneciendo luego estables. Debido a sus características etológicas y su origen en climas tropicales, los ecotipos africanos no presentan la capacidad de expandir sus poblaciones más allá de los climas templados. No obstante, Dietz *et al.* (1985) y Porrini *et al.* (2019) registraron poblaciones que exhibían origen africano en la región PATAGONIA, bajo la hipótesis de ser colonias derivadas de expansiones de enjambres antiguos de *A. m. scutellata*.

Se han utilizado diversos métodos de análisis moleculares y morfológicos para el estudio del origen de las abejas y la introgresión de genes en sus poblaciones. Entre ellos, el ADN mitocondrial (ADNmt) ha probado ser una herramienta valiosa y precisa para estudios filogeográficos a nivel de especie y subespecie (Avise *et al.*, 1987; Cornuet *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1992; Franck, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Quezada-Euan *et al.*, 2003; De La Rúa, 2005; Collet *et al.*, 2006; Abrahamovich *et al.*, 2007; Meixner *et al.*, 2013; Branchiccela *et al.*, 2014; Pinto, 2014; Kono *et al.*, 2015; Dominguez-Ayala *et al.*, 2016; Rangel *et al.*, 2016; Genchi García *et al.*, 2018). Esta molécula circular, contenida en las mitocondrias, oscila entre los 16.000 y 17.000 pares de bases (pb) (Cornuet *et al.*, 1991) y fue completamente secuenciada por primera vez por Crozier *et al.* (1993) (Figura 1.2). La variabilidad en su longitud depende principalmente de la región control y de la región ubicada entre el gen del ARN de transferencia de la leucina (ARNt^{leu}) y el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) (Cornuet *et al.*, 1991; De Rúa *et al.*, 1998).

Figura 1.2 - Mapa de ADN mitocondrial correspondiente a *A. mellifera*, modificado de Crozier *et al.* (1993). El cromosoma contiene 13 genes codificantes de proteínas, 2 ARN ribosomales, 22 ARN de transferencia y 1 región rica en A+T. Se destacan en blanco y con recuadros azules las dos regiones a las que corresponden los fragmentos utilizados para evaluar polimorfismos.



Si bien se caracteriza por sus genes conservados, presenta un alto nivel de sustitución de nucleótidos (Péntek-Zkar *et al.*, 2015), que permiten determinar la pertenencia de una población a los diversos linajes evolutivos de la especie. Se transmite únicamente por línea materna (Crozier *et al.*, 1989; Cornuet *et al.*, 1991; Péntek-Zkar *et al.*, 2015), toda la cría de una misma reina va a compartir el mismo ADNmt, y la colonia se convierte, entonces, en el individuo de interés para el análisis. Por ello, el haplotipo mitocondrial o mitotipo de una sola abeja obrera es usualmente considerado representativo de la colonia (Sheppard *et al.*, 2000).

El análisis del ADNmt, puede utilizarse para evaluar el grado de parentesco entre poblaciones del género *Apis* (De la Rúa *et al.*, 1998), la ancestría de colonias individuales (De La Rúa *et al.*, 2009), los patrones de introgresión entre poblaciones híbridas (Sheppard *et al.*, 2000), el proceso de colonización de un linaje sobre otro o la caracterización de distintos linajes evolutivos (Garnery *et al.*, 1992), y la diversidad genética de las subespecies y sus ecotipos (Cornuet *et al.*, 1991; Aizen *et al.*, 2009). La variabilidad en el tamaño de la secuencia utilizada, combinada con el uso de enzimas de restricción para la determinación de sitios polimórficos, permite la asignación de haplotipos mitocondriales a los diferentes linajes evolutivos (Garnery *et al.*, 1993). Particularmente, un fragmento del gen de citocromo b (cytB) comprende un sitio diagnóstico que puede ser reconocido por la enzima de restricción *BglIII*, siendo capaz de discriminar el origen de las poblaciones analizadas entre africano y europeo (Crozier *et al.*, 1991); mientras que la enzima *DraI* permite evaluar un número significativo de polimorfismos correspondientes a las principales ramas evolutivas de la especie, para la región intergénica hallada entre los fragmentos de la subunidad I y II del gen de citocromo oxidasa (ARNt^{leu}-COII), por el alto grado de variación genética que existe entre los diferentes linajes (Cornuet *et al.*, 1991; Garnery *et al.*, 1993; Rortais *et al.*, 2011; Düttmann *et al.*, 2022)(Figura 1.2). Las colonias de abejas importadas a América, que contribuyeron a la formación de poblaciones en el continente y, particularmente, en Argentina, pertenecen a los linajes C, M y A (Kerr, 1967; Schneider *et al.*, 2004; Carpenter *et al.*, 2021; Zárate, 2022)(Figura 1.1) y, en consecuencia, son los analizados para este trabajo de tesis.

El presente capítulo provee la asignación de haplogrupos maternos a las poblaciones productivas de abejas de Argentina, su frecuencia y actual distribución geográfica, a partir de la utilización de dos loci polimórficos del ADNmt, con la finalidad de conocer el origen materno de las poblaciones y las implicancias que puede tener en la producción. De igual modo, se evalúa el estado del proceso de africanización de las poblaciones y los límites propuestos para el mismo, luego de 68 años de la introducción de *A. m. scutellata* en el continente.

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el origen materno de las poblaciones productivas de abejas de Argentina, e identificar los mitotipos presentes, con el fin de evaluar la proporción de colonias de linaje africano/europeo y su distribución.

2. Evaluar, de acuerdo con la distribución de los haplogrupos por región productiva, el avance del proceso de africanización en las poblaciones y sus límites.
3. Discutir las implicancias de la presencia de africanización y su regionalización en las colonias productivas del país.

1.2. HIPÓTESIS

1. Las poblaciones de abejas melíferas de Argentina pertenecen a diversos haplogrupos correspondientes a diferentes orígenes maternos, cuya distribución varía latitudinalmente de acuerdo con la región geográfica.
2. El proceso de africanización de las poblaciones de *A. mellifera*, se encuentra en constante avance hacia latitudes más australes, y es favorecido por los cambios climáticos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Argentina fue dividida en cinco zonas de muestreo, de acuerdo con la regionalización descripta en Ferrari *et al.* (2011).

Un total de 402 colonias fueron muestreadas durante otoño y primavera entre los años 2016-2022 (Figura 1.3a y b – Tabla 1.1), con la colaboración de técnicos y productores apícolas, la Unidad de Coordinación Apícola del Ministerio de Desarrollo Agrario de la provincia de Buenos Aires y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). El número de colmenas analizadas por región se determinó en relación con la proporción de colonias productivas en cada una de ellas, respecto del total en el país (RENAPA, 2023).

Región	Provincia	Nº muestras	Linaje materno	Nosema sp.	Varroa sp.	Paenibacillus larvae	Melissococcus plutonius	Ascosphaera apis	Virus
CENTRO	Buenos Aires	Cuenca del Salado	105	104	80	99	92	92	88
		Noroeste	38	38	37	38	38	38	19
		Delta	8	8	8	8	8	8	8
		Metropolitana	10	10	10	8	10	10	10
		Norte	11	11	11	11	11	11	11
		Sudoeste	33	33	33	33	33	33	27
	Entre Ríos	39	39	37	39	39	39	39	39
	Santa Fe	24	23	22	23	23	23	23	24
	Córdoba	41	41	41	41	41	41	41	41
	Misiones	15	15	11	11	15	15	15	15
NEA	Jujuy	4	4	4	4	4	4	4	4
NOA	Tucumán	5	5	5	5	5	5	5	5
	Catamarca	2	2	1	2	2	2	2	2
CUYO	San Luis	10	7	6	7	7	7	7	10
	Mendoza	19	19	19	19	19	19	19	19
PATAGONIA	La Pampa	18	18	16	18	18	18	18	13
	Río Negro	20	19	20	20	20	20	20	20
TOTAL		402	396	361	386	385	385	385	355

Tabla 1.1 – Número de muestras obtenidas por provincia y región productiva. La provincia de Buenos Aires se encuentra dividida en las zonas productivas propuestas por la Unidad de Coordinación Apícola. Se encuentra resaltada la columna correspondiente a las muestras analizadas para determinación de linaje materno.

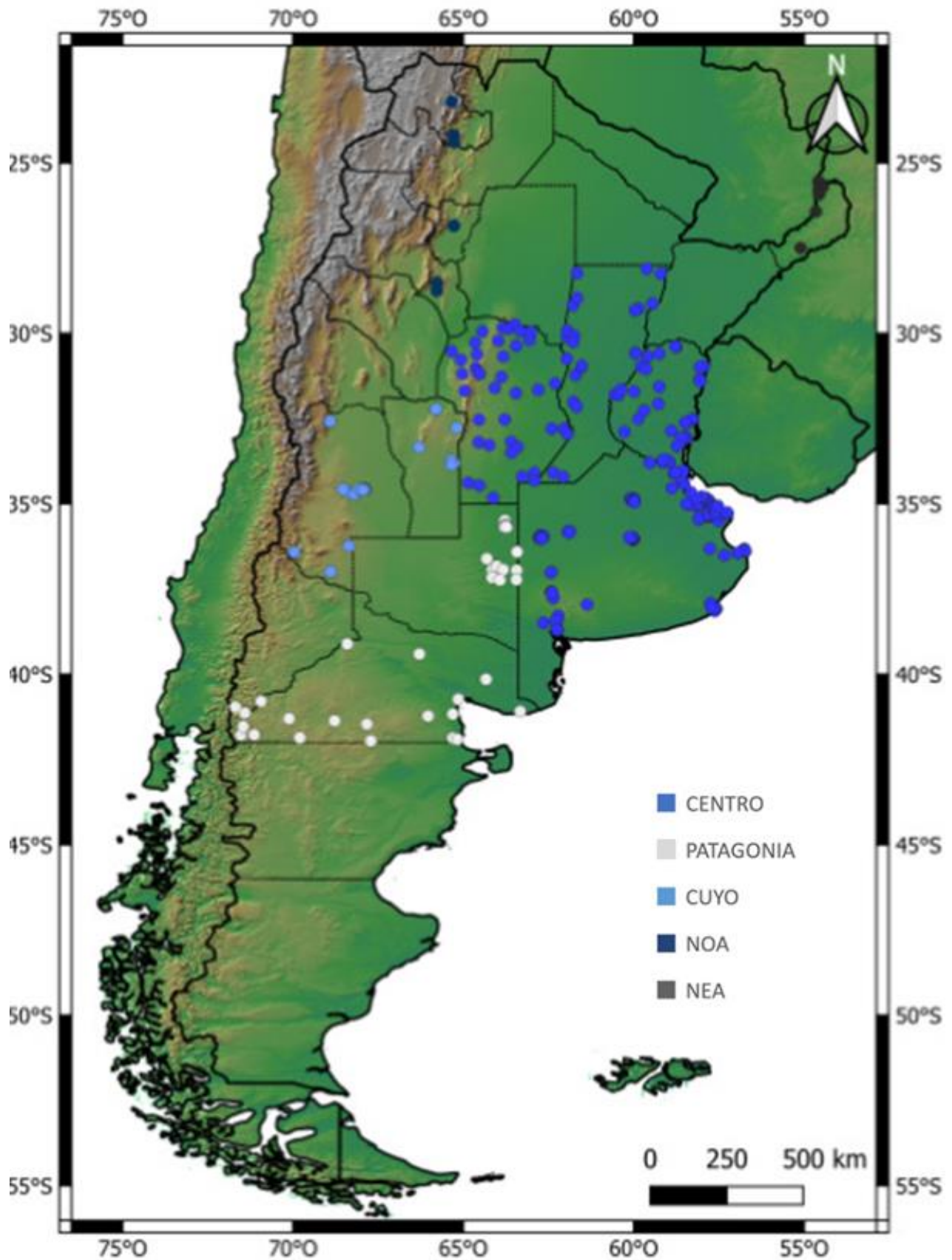


Figura 1.3a - Ubicación de los 402 sitios de muestreo. Cada sitio se encuentra representado con el color de la región de pertenencia, indicado en las referencias del mapa. Realizado con el software Quantum Gis 3.24 (QGis, 2023).



Muestreo en la región NOA. Se ilustran los sitios de muestreo y colmenas muestreadas. Las fotografías corresponden a los muestreos realizados en apiarios de la provincia de Tucumán (arriba).

Muestreo en la región CUYO. Se ilustran los sitios de muestreo, colmenas muestreadas y la organización de las colmenas en los apiarios. Las fotografías corresponden a los muestreos realizados en la provincia de Mendoza (a la derecha).



Muestreo en la región CENTRO. Se ilustran los sitios de muestreo, colmenas muestreadas y la organización de las colmenas en los apiarios de diferentes zonas. Las fotografías corresponden a los muestreos realizados en la provincia de Buenos Aires (a la izquierda).

Figura 1.3b - Imágenes de algunos muestreos realizados para las regiones NOA, CENTRO y CUYO que ilustran los sitios referenciados en el mapa de la figura 1.3a.

Para la determinación genética de linajes maternos, las muestras fueron conservadas en alcohol etílico 96% a -20°C hasta su utilización. El ADN total de 396 muestras fue extraído de acuerdo con el protocolo que a continuación se detalla, adaptado a partir de la técnica de extracción con DNAzol® (Invitrogen™ Massachusetts, USA) propuesta por el fabricante y de los trabajos publicados por Crozier *et al.* (1991) y Garnery *et al.* (1991), con modificaciones para aplicación sobre abejas melíferas y otros insectos. El mesosoma de un individuo por muestra, previamente lavado con agua destilada para eliminar restos de alcohol, fue separado de la cabeza y el metasoma. Posteriormente, se realizó una incisión ventral en el mesosoma, desprovisto de alas y apéndices, para extraer la musculatura torácica y eliminar la cutícula. La musculatura fue colocada en un tubo eppendorf™ de 1,5ml con 200µl de DNAzol®, realizando un macerado con ayuda de un micropilón. A continuación, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, mezclando periódicamente en un agitador de tipo vórtex, y luego se centrifugó por 5 minutos a 10.000rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo que contenía 300µl de DNAzol®, homogeneizando suavemente la mezcla por pipeteo, previo a ser centrifugado durante 10 minutos a 13.000rpm. Para precipitar los ácidos nucleicos y separar las proteínas, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, con igual volumen de alcohol isopropílico frío y se mezcló por inversión del tubo. La mezcla se incubó durante 15 minutos a -20°C y luego se centrifugó 20 minutos a 13.000rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 200µl de alcohol etílico 70%, con agitación durante 10 segundos, para luego ser centrifugado durante 5 minutos a 13.000rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 15 a 20 minutos. Para resuspender el ADN, el pellet seco fue hidratado con 50µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM) y llevado a un termobloque seco con agitación (Thermomixer Eppendorf™) durante 20 minutos a 550rpm y 60°C para completar la disolución del pellet. La muestra se mantuvo *overnight* a 4°C, con intervalos de agitación para su correcta resuspensión y, posteriormente, se conservó a -20°C hasta su utilización. La eficiencia de las extracciones fue corroborada en geles de agarosa al 1% [0,8g agarosa/80ml de TBE1x (trisaminometano, ácido bórico, EDTA 0,5M pH=8)], teñidos con 3µl de gelRed® (Biotium) y analizados con un sistema de documentación de geles (GelDoc™XR+, Bio-Rad), mientras que la concentración y calidad del ADN fueron medidas a partir de la absorbancia a una longitud de onda de 260nm y 260/230nm en un espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000-ThermoFisher Scientific), con la cuantificación del ADN en nanogramos (ng) de ADN extraído por microlitro (µl) de solución.

Adicionalmente, se han probado diversos protocolos de extracción para comparar la eficiencia de cada uno de ellos y la calidad del ADN extraído de acuerdo a los tipos de muestra utilizados, formas de conservación y protocolos propuestos por Kocher *et al.* (1989); Walsh *et al.* (1991); Crozier *et al.* (1991); Cornuet & Garnery (1991) y Garnery *et al.* (1993), cuyos resultados han presentado menor efectividad que el protocolo seleccionado.

Posteriormente, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida por la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), que permitió, a partir del análisis de la

variación en los patrones de restricción, determinar la proporción de haplogrupos europeos y africanos en las poblaciones. Para el desarrollo de la técnica de PCR, se utilizaron dos marcadores moleculares mitocondriales, a partir de los cuales se evaluaron los patrones obtenidos por RFLP mediante la utilización de las enzimas *BglII* y *DraI*, determinando la pertenencia de cada muestra a un haplogrupo mitocondrial específico.

Inicialmente, se amplificó un fragmento de 485bp perteneciente al Citocromo b a partir de los *primers* 5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' y 5'-ATTACACCTCTAATTATTAGGAAT-3' (Crozier *et al.*, 1991). Las coordenadas de los *primers* son las posiciones 11524-11549 y 11983-12008 en la secuencia de referencia del genoma mitocondrial de *A. mellifera* con *accession* NC_051932 en GenBank. La reacción de amplificación en cadena se realizó en un volumen total de 10µl, de los cuales 2µl correspondieron al ADN extraído y, los 8µl restantes, a la mezcla compuesta por GoTaq®ADN polimerasa (5u/µl, Promega), GoTaq®buffer 5x, dNTPs 10mM, *primers* (12,5pM/µl) y agua ultrapura libre de nucleasas (sistema Milli-Q®), utilizando el perfil de temperaturas propuesto por Pinto *et al.* (2003), con modificaciones -desnaturalización inicial a 94°C durante 45 segundos, 35 ciclos de amplificación de 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos y, una extensión final a 72°C durante 2 minutos- en un termociclador Mastercycler Nexus (Eppendorf™). Adicionalmente, se utilizó un control negativo de reacción (sin agregado de ADN). El producto de amplificación fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y digerido con la enzima *BglII* (R0144S, New England BioLabs®) utilizando las condiciones recomendadas por el proveedor (incubación a 37°C *overnight*) con agitación, en termobloque seco (Thermomixer Eppendorf™). El volumen total de la

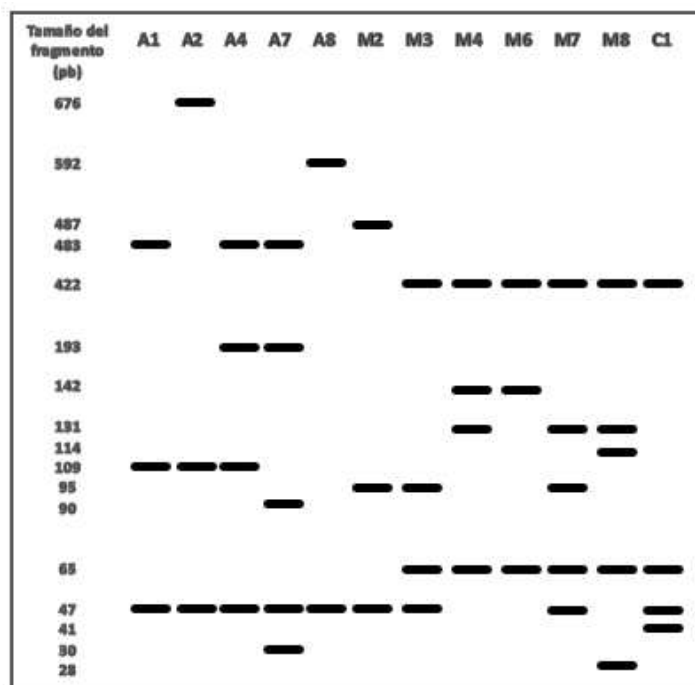


Figura 1.4 – Patrones de restricción del fragmento intergénico ARNt^{leu}-COII digerido con la enzima *DraI*, para los haplogrupos hallados en Argentina (modificado de Garnery *et al.*, 1993)

digestión fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (1,6g agarosa/80ml de TBE1x), teñidos con GelRed® (Biotium), visualizados con luz UV en un sistema de documentación de geles (GelDoc™XR+, Bio-Rad), al que se adicionaron un control negativo de reacción y un control positivo para cada polimorfismo. Las muestras provenientes de poblaciones de linajes africano y no africanos (incluye a todos los linajes europeos) fueron diferenciadas por medio de los patrones de restricción. El fragmento amplificado del cytB es polimórfico en la posición 11817 de la secuencia de referencia NC_051932, donde la presencia de un residuo T genera un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *BglII* en posición

11814, común a linajes europeos, que resulta en la obtención de dos fragmentos de 194pb y 291pb; mientras

que los linajes africanos, portadores de 11817C, carecen de un sitio de restricción para *Bgl*III en posición 11814 y se mantienen sin digerir, exhibiendo un único fragmento de 485pb.

Adicionalmente, la asignación de cada una de las poblaciones a un haplogrupo específico dentro de cada linaje, se realizó a partir de la utilización del fragmento mitocondrial ubicado en la región intergénica de los genes de la Citocromo Oxidasa I y Citocromo Oxidasa II (COIARNt^{leu}-COII). La amplificación se llevó a cabo utilizando los *primers* 5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3' y 5'-CAATATCATTGATGACC-3' (Garnery *et al.*, 1992) en un volumen total de 10µl, de los cuales 2µl correspondieron al ADN extraído y, los 8µl restantes, a la mezcla compuesta por GoTaq®ADN polimerasa (5u/µl), GoTaq®buffer 5x, dNTPs 10mM, *primers* (12,5pM/µl) y agua ultrapura libre de nucleasas (sistema Milli-Q®) utilizando el perfil de temperaturas propuesto por Garnery *et al.* (1993), con modificaciones -desnaturalización inicial a 94°C durante 45 segundos, 30 ciclos de amplificación de 92°C durante 1 minuto, 47°C durante 45 segundos, 72°C durante 45 segundos y, una extensión final a 72°C durante 2 minutos- en un termociclador Mastercycler Nexus (Eppendorf™). Adicionalmente, se utilizó un control negativo de reacción (sin agregado de ADN). El producto de amplificación fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y digerido con la enzima *Dra*I – CutSmart (R0129S, New England BioLabs®) utilizando las condiciones recomendadas por el proveedor (incubación a 37°C por 15 minutos) con agitación, en termobloque seco. El producto de digestión fue analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida [solución de acrilamida-bisacrilamida (19:1), persulfato de amonio (0,4g/ml) y tetrametiletilendiamina (TEMED – ThermoFisher Scientific)] al 10% y al 40% en TBE1x, para visualizar el patrón de restricción completo de cada muestra. Todos los geles fueron teñidos con GelRed® y observados bajo luz UV con el sistema de documentación de geles GelDoc™XR+. Cada haplogrupo fue identificado por el patrón de restricción correspondiente, de acuerdo con Garnery *et al.* (1993 – Figura 1.4).

3. RESULTADOS

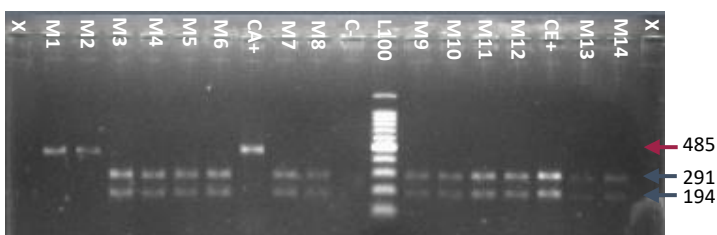


Figura 1.5 - Gel de agarosa para los patrones de restricción producto de la digestión con *Bgl*III. La referencia de la siembra en cada calle se muestra en la parte superior de la figura, siendo, **L100** correspondiente al Ladder de 100pb, **C-** el control negativo de reacción, **CA+** y **CE+** los controles positivos para linaje materno africano y europeo y **M1-M14** las muestras analizadas. **X** corresponde a calles sin sembrar. Las flechas indican la longitud de cada fragmento amplificado, en morado 485pb para fragmentos no digeridos y, en azul 291pb y 194pb para fragmentos que contienen el sitio de restricción.

El origen materno de cada una de las poblaciones muestreadas fue determinado a partir del análisis de las variaciones de los patrones de restricción de las enzimas *Bgl*III y *Dra*I para los fragmentos amplificados contenidos en las regiones pertenecientes al gen mitocondrial *cytB* y la región intergénica ARNt^{leu}-COII. Estas variaciones permitieron la asignación de haplogrupos y distinción entre linajes mitocondriales pertenecientes a las tres ramas evolutivas de la especie A, C y M,

pudiendo diferenciar la introgresión de genes africanos en dichas poblaciones. Los fragmentos obtenidos para el análisis de patrones de restricción de la región del *cytB*, se muestran en la Figura 1.5.

Para la región intergénica *ARNt^{leu}-COII* el abanico de patrones de restricción es mayor y se expone en la Figura 1.4 para los haplogrupos hallados. La metodología utilizada permitió la correcta asignación de un total de 12 haplogrupos mitocondriales (A1, A2, A4, A7, A8, C1, M2, M3, M4, M6, M7 y M8) en las 396 colonias muestreadas a lo largo del país (Tabla 1.2), correspondientes a los linajes evolutivos C (71,72%), M (11,95%) y A (16,33%), cuatro de los cuales han sido determinados por primera vez en el país: M7, M8, A2 y A7 (Figura 1.6).

Región	Provincia	Nº muestras	Linaje materno	Haplogrupos europeos						Haplogrupos africanos					
				C1	M3	M7	M4	M8	M2	M6	A4	A1	A2	A8	A7
CENTRO	Buenos Aires	Cuenca del Salado	105	104	85	5	3	-	1	-	-	8	-	2	-
		Noroeste	38	38	35	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-
		Delta	8	8	2	4	-	-	-	-	1	1	-	-	-
		Metropolitana	10	10	9	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
		Norte	11	11	9	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
		Sudoeste	33	33	30	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	Entre Ríos		39	39	26	1	1	1	-	-	7	-	-	2	1
	Santa Fe		24	23	16	-	-	-	-	-	5	2	-	-	-
	Córdoba		41	41	22	-	7	-	-	2	7	3	-	-	-
	Misiones		15	15	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-
NEA	Jujuy		4	4	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
NOA	Tucumán		5	5	3	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	Catamarca		2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	San Luis		10	7	3	1	-	1	-	-	1	1	-	-	-
CUYO	Mendoza		19	19	9	7	2	-	-	-	-	1	-	-	-
PATAGONIA	La Pampa		18	18	14	-	2	-	1	-	1	-	-	-	-
	Río Negro		20	19	17	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
TOTAL		402	396	284	21	16	3	3	2	2	50	10	2	2	1

Tabla 1.2 - Haplogrupos de *A. mellifera* presentes en poblaciones de la República Argentina discriminados por región y provincia.

Todos los patrones observados para la restricción de la enzima *DraI* fueron asignados a alguno de los haplogrupos propuestos por Garnery *et al.* (1993), presentando correspondencia con el linaje materno asignado a partir del patrón obtenido por el análisis del fragmento del *cytB*.

Un 83,67% del total de las poblaciones muestreadas ha exhibido pertenencia a linajes maternos europeos con distribución en cuatro de las cinco regiones productivas muestreadas, mientras que las colonias derivadas de reinas con origen africano han sido halladas en todas las regiones, compartiendo hábitat y recursos con las primeras, aunque con menor proporción de representación (Figuras 1.6 y 1.7).

Para mejor descripción del análisis de los datos, se exponen los valores porcentuales de presencia de linajes europeos y africanos para cada región productiva (distribución y valores en las Figuras 1.6 y 1.7). Hacia el norte de los ~30°S, los haplogrupos mitocondriales africanos reunieron un 36,36% de las poblaciones muestreadas para la región NOA y, la totalidad de las colonias analizadas para la región NEA. En ambos casos, el haplogrupo determinado para el linaje A fue el A4, mientras que, para las poblaciones de origen europeo presentes en la región NOA, el linaje hallado fue el C, con presencia del haplogrupo C1.

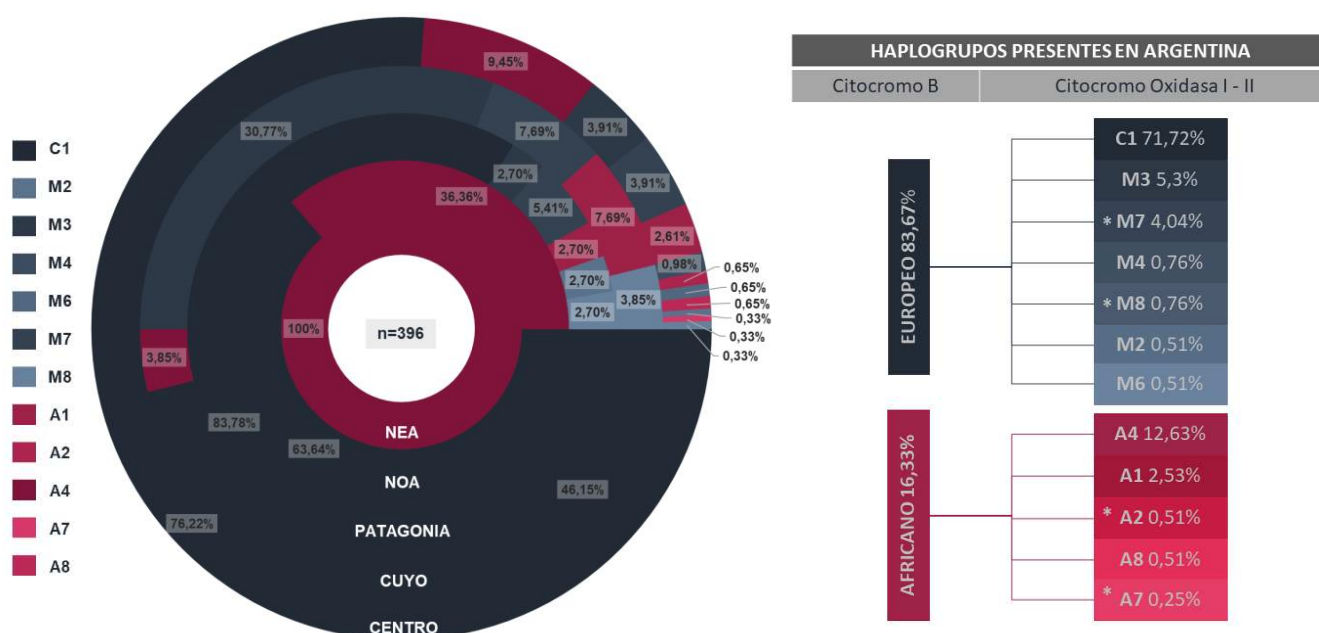


Figura 1.6 - Proporción de linajes y haplogrupos de *A. mellifera* en poblaciones de la República Argentina.

A la derecha, se observan las proporciones de linajes europeos y africanos, juntamente con los haplogrupos hallados para cada uno de los linajes, correspondientes a los fragmentos mitocondriales analizados cytB y ARNt^{leu}-COII. Los asteriscos (*) representan haplogrupos mitocondriales descritos por primera vez en el país.

A la izquierda, se observan las frecuencias de haplogrupos representadas en anillos y por región. La aparición de los haplogrupos se ordena según predominancia en el país (comenzando por C1 y finalizando por A7, según corresponda). La ubicación de los anillos en el gráfico refiere a la diversidad de haplogrupos por región, encontrándose más externamente las regiones con mayor diversidad e internamente, las menos diversas.

En el centro del país, aproximadamente entre los 30° y 42° de latitud Sur, los linajes europeos tuvieron mayor representación que en las regiones del norte, aunque la variabilidad de los linajes africanos fue mayor comparado con el norte y sur del país. La región CENTRO fue la que mayor número de haplogrupos exhibió, pertenecientes en un 86,32% a los linajes europeos C y M. El análisis de los patrones de restricción de la enzima *DraI* permitió asignar las poblaciones muestreadas a los haplogrupos C1, M3, M7, M4, M6, M2 y M8, mientras que las poblaciones con origen materno africano fueron asignadas a los haplogrupos A4, A1, A2, A8 y A7.

Para la región CUYO, la representación de linajes europeos fue del 88,46% asignando las poblaciones a los haplogrupos C1, M3, M7 y M8, mientras que el linaje africano A, fue representado por los haplogrupos A1 y A4. Hacia el sur de los ~42°S, se encuentra únicamente la región PATAGONIA, en la que las poblaciones de origen materno europeo dan cuenta del 97,3% de las poblaciones analizadas, con pertenencia a los linajes C y M y asignación a los haplogrupos C1, M3, M7, M2 y M8. El haplogrupo A4 fue el único representante del linaje africano para estas poblaciones (Figura 1.7).

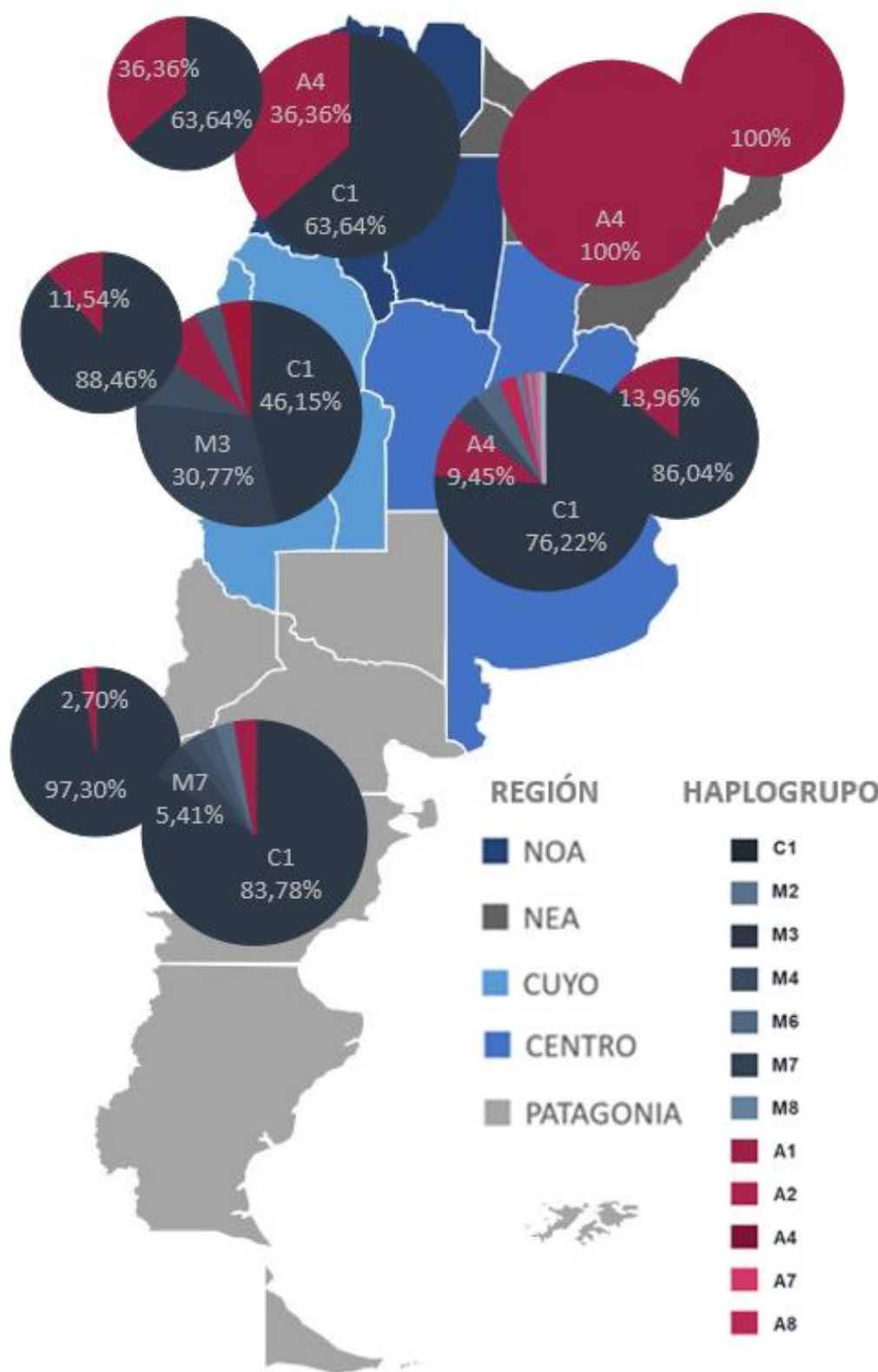


Figura 1.7 - Distribución de haplogrupos de *A. mellifera* en la República Argentina. En el mapa se encuentran graficados por región los resultados de ambos marcadores, detallando las frecuencias de linajes europeos en conjunto (M y C) y el africano (A) en los gráficos de torta pequeños correspondientes al análisis del fragmento del cytb, y solamente los haplogrupos de mayor proporción de aparición en los gráficos de mayor tamaño, corresponden al análisis del fragmento ARNt^{leu}-COII.

4. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este capítulo brindan una descripción actualizada de la pertenencia a los linajes africano y europeo de las poblaciones de *A. mellifera* de Argentina, así como su distribución a lo largo del país y la diversidad de haplogrupos mitocondriales presentes en cada una de las regiones productivas. Los análisis realizados permitieron interpretar la variabilidad genética en torno a las regiones muestreadas y sus características. Del mismo modo, se amplió la detección de haplogrupos a nivel nacional y se discriminó por regiones productivas, adicionando provincias que no habían sido muestreadas con anterioridad a los fines de este estudio.

En un escenario de predominancia de haplogrupos africanos y poblaciones africanizadas en el continente americano (Taylor, 1977; Bierzychudek, 1979; Buchmann, 1982; Harper, 1982; Locke y Cobey, 1986; Moffet *et al.*, 1987; Kent, 1988; Ruttner, 1988; Lobo Segura, 2000; Caron, 2001; Clarke *et al.*, 2001; 2002; Pérez-Castro *et al.*, 2002; Quezada-Euan *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005; Collet *et al.*, 2006; Whitfield *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2007; Kraus *et al.*, 2007; Salamanca Grosó, 2009; Guzman-Novoa *et al.*, 2011; Branchiccela *et al.*, 2014; Harpur *et al.*, 2015; Kono y Kohn, 2015; Dominguez-Ayala *et al.*, 2016; Rangel *et al.*, 2016; Tibatá *et al.*, 2018a; Acevedo-Gonzalez *et al.*, 2019; Tihelka *et al.*, 2020; Alburaki *et al.*, 2022), los resultados obtenidos para los análisis de los polimorfismos de fragmentos de restricción mitocondriales revelan una clara predominancia de linajes maternos europeos (83,67%) para el país, aunque con variaciones en la diversidad y dominancia de haplogrupos por región, en consonancia con otros reportes tanto en estudios locales como nacionales (Dietz *et al.*, 1985; Abrahamovich *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2018; Genchi García *et al.*, 2018; Porrini *et al.*, 2019). Sin embargo, la presencia de poblaciones tanto de origen materno europeo como africano ha sido determinada en todo el país, compartiendo hábitat y recursos.

Las variantes de ADNmt están asociadas a la caracterización de la zona biogeográfica en que se encuentran (Pedersen, 1996; Smith, 1991). Las condiciones climáticas son el primer factor involucrado en la selección natural de las abejas melíferas, pero la variedad de mitotipos presentes en cada región no sólo es resultado de ellas y de los diferentes comportamientos de migración, sino también de las prácticas apícolas, como el reemplazo de reinas, que muestran un gran impacto en la diversidad genética de las poblaciones (Guzmán-Novoa *et al.*, 2011a; Tibatá *et al.*, 2018a; Düttmann *et al.*, 2021, 2022); el cruzamiento entre subespecies (Muñoz, 2014; Péntek-Zakar *et al.*, 2015); los eventos de trashumancia (movimiento de colonias entre diferentes regiones geográficas); o la aplicación de programas de inseminación y mejoramiento que tienden a seleccionar características de diversas subespecies.

Se reconocen más de 100 haplotipos a partir de la utilización de técnicas de PCR-RFLP (de la Rúa *et al.*, 2009) de los cuales 12, pertenecientes a los linajes evolutivos C, A y M, han sido determinados en este estudio. La presencia de una amplia variabilidad genética es crucial para la supervivencia a largo plazo de las poblaciones,

para sobreponerse a desafíos como la pérdida de hábitat y el cambio climático (Hoban *et al.*, 2013; Shafer *et al.*, 2015; Hohenlohe *et al.*, 2021; Patenkovic *et al.*, 2022).

El linaje con mayor representación fue el C (71,72%), para el que se determinó el haplogrupo C1 con predominancia en todas las regiones analizadas, a excepción de la región NEA. Los haplotipos mitocondriales característicos de este linaje son los de las subespecies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia* y *A. m. cypria*, siendo los primeros dos, ejemplos de subespecies históricamente importadas en el continente americano (Ruttner 1988; Ilyasov *et al.*, 2020; Alburaki *et al.*, 2022) y reconocidas como las más empleadas en la actividad apícola por su docilidad y alta producción de miel (Ruttner 1988; De la Rúa *et al.*, 2009). Es el linaje preeminente en las poblaciones de abejas del continente en latitudes y condiciones climáticas similares a las de Argentina (Rortais *et al.*, 2010; Alburaki *et al.*, 2022). En particular, *A. m. ligustica*, caracterizada por el haplotipo C1, se encuentra distribuida en un amplio rango geográfico y climático (Alburaki *et al.*, 2022) en el continente americano.

El linaje europeo M comprende un gran número de haplotipos documentados que caracterizan dos subespecies, *A. m. mellifera* y *A. m. iberiensis* (Franck *et al.*, 1998; Rortais *et al.*, 2011; Chávez-Galarza *et al.*, 2017; Henriques *et al.*, 2018), de los cuales 6 se encuentran representados en este estudio: M3 (5,3%), M7 (4,04%), M4 (0,76%), M8 (0,76%), M2 (0,51%), M6 (0,51%), entre los que los casos de M7 y M8 constituyen el primer registro en el país. Este linaje conforma el 11,95% de las poblaciones analizadas y presenta mayor diversidad de haplogrupos en comparación con los trabajos de Abrahamovich *et al.* (2007) y Agra *et al.* (2018). Considerando la gran diversidad genética del linaje en su zona de origen y los múltiples ecotipos identificados (Louveaux, 1973), era esperable una mayor integración de las abejas del linaje M en la actividad apícola argentina, aunque estos resultados pueden deberse a que el haplogrupo C1 es el preferido para la producción apícola. Pese a ser el linaje con menor representación en el país, es aquel con mayor diversidad interna medida en términos de cantidad de haplogrupos distintos, representados exclusivamente en el centro y sur del país. Particularmente, la región CENTRO presentó la mayor variabilidad de haplogrupos, con M3, M7, M4, M6, M2 y M8; seguido por PATAGONIA con los haplogrupos M3, M7, M2 y M8; y, finalmente, CUYO, con la determinación de M3, M7 y M8. La presencia del linaje M en el centro y sur del país podría estar relacionada a las características de clima templado y templado frío de esas regiones, en relación con las condiciones climáticas en su zona de origen. El haplotipo M2 encierra una controversia, ya que pese a haber sido descrito por Garnery *et al.* (1993) dentro del linaje europeo M, y determinado en este trabajo como perteneciente a linaje europeo, Rortais (2010) propone contrariamente la pertenencia al linaje A. Esta reubicación introduce una nueva discusión sobre la distribución de este haplogrupo, dado que su presencia, tanto en el centro como en el sur del país, contribuiría a aumentar los niveles de africanización, sobre todo de las poblaciones en PATAGONIA, aunque nuevos estudios que incluyan secuenciaciones completas son necesarios para tal fin.

Adicionalmente, la baja frecuencia del linaje M sugiere que la importación de reinas pertenecientes a este linaje es menor a las pertenecientes al linaje C, que este linaje no ha sido incorporado en programas de

mejoramiento, o que no es buena base para híbridos, si bien la contribución del linaje M al genoma de las abejas africanizadas es importante y no se elimina por completo (Clarke *et al.*, 2002; Cridland, *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2006).

Por último, el linaje A aportó a la determinación de las poblaciones analizadas con la presencia de los haplogrupos mitocondriales A4 (12,63%), A1 (2,53%), A2 (0,51%), A8 (0,51%) y A7 (0,25%). Particularmente, el mitotipo A4 en las poblaciones de la región NOA, NEA y PATAGONIA; los haplogrupos A4, A1, A2, A8 y A7 en la región CENTRO; A1 y A4 en CUYO, siendo el centro del país el que mayor variabilidad de haplogrupos africanos presentó. Mientras que los mitotipos A1, A4, A8, A11 y A30 han sido identificados previamente para Argentina (Abrahamovich, *et al.*, 2007; Agra *et al.*, 2018), A2 y A7 han sido detectados por primera vez en el país. Este linaje es considerado el de mayor diversidad genética (Calfee *et al.*, 2020; Espregueira Themudo *et al.*, 2020; Harpur *et al.*, 2012; Wallberg *et al.*, 2014, Franck 2001), comprendido por alrededor de 13 subespecies (Franck *et al.*, 2001; Alburaki *et al.*, 2011; Henriques *et al.*, 2022) aunque solo se consideran abejas africanizadas a aquellas provenientes del cruce entre *A. m. scutellata* y aquellas pertenecientes a linajes europeos (Smith & Brown, 1988). Por este motivo, algunos autores como Sheppard *et al.* (1999) estiman que el proceso de africanización está sobreestimado en América, en tanto no todos los genes africanos contenidos en los híbridos provienen de esta subespecie. Pese a que la identificación de ADNmt africano no implica necesariamente la determinación de abejas africanizadas, Garnery *et al.* (1993), Evans *et al.* (2013) y Düttmann *et al.* (2022) adhieren a que el método de *Dral* es altamente adecuado para discriminar colonias africanizadas. Por lo tanto, los marcadores mitocondriales pueden evaluarse como indicadores del grado de africanización de la población de abejas de una región, más aún, teniendo en cuenta que la hibridación entre subespecies de *A. mellifera* ocurre tanto de manera natural (Muñoz, 2014; Péntek-Zakar *et al.*, 2015), como por intervención antrópica. Los haplotipos mitocondriales A4 -correspondiente a *A. m. scutellata* - y A1 -correspondiente a *A. m. iberiensis*-, han sido los más frecuentes en este estudio. Adicionalmente, los análisis filogenéticos realizados en otros países de Latinoamérica refuerzan este resultado, con predominancia de estos dos haplogrupos en sus poblaciones (Collet *et al.*, 2006 –Brasil y Uruguay-; Düttmann *et al.*, 2022 –Nicaragua-; Lobo, 2000 –Costa Rica-; Tibatá *et al.*, 2018a –Colombia-; Dominguez-Ayala *et al.*, 2016; Kraus *et al.*, 2007 –Mexico-), siendo frecuentemente el mitotipo A4 caracterizado, en mayor proporción, en áreas tropicales y subtropicales. Del mismo modo, ambos haplogrupos son comunes y se encuentran ampliamente distribuidos en el continente africano (Techer *et al.*, 2017; Amapke, 2018; Alburaki *et al.*, 2022). En este sentido, los resultados pueden estar reflejando directamente las introducciones de abejas desde África, aunque la presencia del haplogrupo A1 puede estar reflejando la expansión de genes africanos, producto de la importación de abejas desde la Península Ibérica, previo a la introducción de *A. m. scutellata* (Sheppard *et al.*, 1991). El establecimiento de reinas pertenecientes al haplogrupo A4, con características propicias para adecuarse a los climas de la región en el norte del país, ha desplazado a otros haplogrupos, a excepción del ampliamente distribuido C1 hallado en NEA. Este desplazamiento probablemente fue posible a partir del reemplazo gradual de las poblaciones

europas (Caron, 2001; Collet *et al.*, 2006; Davila *et al.*, 1980; Guzman-Novoa *et al.*, 2011; Lobo Segura, 2000; Salamanca Grosso, 2009). Sin embargo, otros haplogrupos correspondientes a este linaje evolutivo están presentes en el muestreo, característicamente asociados a la región con mayor número de colmenas y productores registrados, lo que puede estar indicando la introducción de estos linajes de manera involuntaria en eventos puntuales de importación de genética para la producción, desde otras regiones geográficas en donde estos haplotipos se encuentran bien adaptados.

Tanto las abejas de origen africano como los híbridos africanizados estudiados en el continente se adaptan mejor a ambientes con altas temperaturas y largos períodos de sequía (Guzmán-Novoa *et al.* 2011a; Acevedo-Gonzalez *et al.*, 2019). Además, las poblaciones ubicadas en las regiones del norte del país, con clima subtropical, han experimentado la llegada del linaje africano y la introgresión de sus genes en las poblaciones de manera más temprana, lo que conduce a una mayor proporción de presencia de poblaciones de ascendencia africana. Por otra parte, presentan una dinámica poblacional con características que les confieren una mayor capacidad reproductiva y de dispersión respecto de las poblaciones europeas (Schneider *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005), lo que sugiere la presencia de dominancia entre haplogrupos maternos, siendo el A4 el que mayor predominancia presenta en esta zona.

Las prácticas apícolas son diferentes y adecuadas a las características de cada haplogrupo y región, y los métodos de hibridación y cría selectivos pueden afectar la distribución de las variantes de ADNmt y el *pool* génico de las poblaciones locales, afectando su estructura (Cornuet *et al.* 1991; Hirstov, 2018) con una implicancia significativa para el mantenimiento de la biodiversidad, ya que la producción de híbridos resulta en la pérdida de linajes genéticos que de otro modo podrían actuar como reservorios de alelos únicos, combinaciones de alelos o rasgos adaptativos locales (Byatt *et al.*, 2016). Por lo tanto, el manejo realizado por los apicultores a escala comercial puede tanto aumentar la diversidad genética dentro de sus poblaciones (Harpur *et al.*, 2012, De la Rúa *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2023b), o bien, evaluando la perspectiva desde una escala más amplia, puede contribuir a la reducción de la diferenciación genética entre poblaciones (De la Rúa *et al.*, 2009). Puntualmente, en las poblaciones argentinas, existe un constante flujo de genes, debido a introducciones sucesivas de reinas, que, sumado a las condiciones climáticas, la selección natural y artificial, la trashumancia y la enjambrazón con establecimiento de colonias silvestres, generan una dinámica particular en la estructura genética de la especie, limitando el avance de los haplogrupos africanos sobre los europeos, en especial, en la región CENTRO.

La gran presencia de poblaciones pertenecientes al linaje C en el país podría sugerir que no ha transcurrido tiempo suficiente desde la llegada de *A. m. scutellata* como para alcanzar altos niveles de ancestría africana reflejados en latitudes más altas. Sin embargo, estas abejas ya estaban presentes en el país para 1965 y Pinto *et al.* (2005) han demostrado que la ancestría africana puede alcanzar niveles altos, aparentemente estables, en menos de una década. Alternativamente, y como proponen Clarke *et al.*, (2002), la gran población de abejas europeas que existía en Argentina previo a la llegada de las poblaciones africanas puede haber servido

como *buffer* genético, permitiendo la persistencia del linaje C, a pesar del tiempo transcurrido desde el primer contacto entre poblaciones.

Tanto la presencia de los linajes A, M y C, como la predominancia del linaje C en las poblaciones poseen relación con los recientes registros de Alburaki *et al.* (2022) y Rangel *et al.* (2020) para poblaciones del norte del continente, aunque los resultados exhibidos en este capítulo para latitudes australes muestran una mayor proporción de haplotipos pertenecientes a los linajes A y M.

De acuerdo con la variación propuesta por Calfee *et al.* (2020) se puede apreciar la conformación de un gradiente latitudinal por regiones en Argentina, teniendo en cuenta la cercanía al primer punto de detección de abejas de origen materno africano en el país, las condiciones climáticas de cada región y las prácticas apícolas que contribuyen a modelar la genética poblacional de las colonias productivas. La presencia de ancestría africana decrece conforme aumenta la latitud (Adjlane *et al.*, 2020; Zárate *et al.* 2022; Alburaki *et al.*, 2022), con predominancia de los haplogrupos africanos solamente en el norte y una muy baja proporción de los mismos en el sur. Particularmente, la región NEA presenta sólo abejas de origen africano, mientras que la región NOA exhibe 1,75 veces más poblaciones de origen europeo que africano. Mientras tanto, para las regiones del centro del país, esta razón aumenta a 6,16 para CENTRO; 7,66 para CUYO; y llega a su valor máximo para la región PATAGONIA, con una razón de 36,04 origen europeo/origen africano, con menor probabilidad de hallar colonias derivadas de reinas de origen materno africano (Figura 1.6). La zona central, con climas templados cálidos, es la que alberga la mayor diversidad y riqueza de haplogrupos, pudiendo hallarse tanto al norte como al sur, sólo a aquellos grupos que presentan características que les permiten adecuarse a las condiciones climáticas de cada zona. La zona central podría actuar como una zona de transición, similar a las zonas de mezcla (poblaciones con introgresión africana y aquellas con origen materno netamente europeo) propuestas en diferentes partes de América (Sheppard, 1999; Pinto *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2006; Zayed y Whitfield, 2008; Wallberg *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2017; Sheppard *et al.*, 1991; Rinderer *et al.*, 1991, 1993).

Por otra parte, el límite del proceso de africanización en el continente ha sido evaluado por numerosos autores que han discutido su avance (Taylor & Spivak, 1984; Dietz *et al.*, 1985; Sheppard *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 2004; Whitfield *et al.*, 2006; Abrahamovich *et al.*, 2007; Kono & Kohn, 2015; Genchi García *et al.*, 2018; Porrini *et al.*, 2019; Calfee *et al.*, 2020; Zárate *et al.*, 2022; entre otros). De este modo, fue modificándose desde su introducción inicial en América, tanto de *A. m. scutellata*, como de los haplotipos representantes del linaje A. Sin embargo, la ratio de dispersión de las abejas africanas disminuyó desde el 2000 (Requier *et al.*, 2020). Las condiciones climáticas son el primer factor involucrado en la limitación de la migración de los haplogrupos africanos y, por lo tanto, del proceso de africanización (Harrison *et al.*, 2006; Southwick *et al.*, 1990; Taylor & Spivak, 1984). Actualmente, Calfee *et al.* (2020) reportan que hasta los 38°N, tanto mitotipos como marcadores nucleares africanos son detectables. Del mismo modo, y aunque la presencia del origen materno africano es mayor que reportes previos realizados para el país, en este trabajo se informa la

presencia del haplogrupo A4 alrededor de los 38°S. Estos límites parecen no ser estables a la luz del cambio climático, aun así, la velocidad de dispersión y el grado de avance de las poblaciones africanas han disminuido, comparados con la expansión neotropical inicial (Schneider *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2005, Requier *et al.*, 2020). Aunque la expansión del proceso pueda estar restringida por los índices de temperatura y las precipitaciones de cada región, factores culturales como la selección de caracteres y la importación de reinas llevadas a cabo por los productores, tienen un rol importante. Todas las regiones han mostrado presencia del linaje africano y su registro en el sur podría ser resultado de enjambres estivales, de las prácticas de trashumancia, o bien, reflejar el avance de los haplogrupos africanos sobre las poblaciones de abejas más australes del país, teniendo en cuenta los embates climáticos en las regiones más frías del planeta, por los efectos del calentamiento global, evidenciado en la supervivencia de abejas con adaptaciones a climas tropicales en latitudes más australes.

La africanización no sólo conlleva la aparición de características que hacen dificultoso el manejo de las poblaciones, sino que podría aportar un salto de calidad para el manejo de la producción en diversas zonas del país, gracias a características como la alta producción de miel y gran capacidad reproductiva (McNally & Schneider, 1992a, 1992b, 1996; Fewell & Bertram, 2002; Breed *et al.*, 2004), menor susceptibilidad y tolerancia a patógenos (Goulson *et al.*, 2015; Guzman-Novoa *et al.*, 1996; Tibatá *et al.*, 2018a; Düttmann *et al.*, 2021, 2022; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011b; Masaquiza Moposita *et al.*, 2020), mayor longevidad (Feliciano-Cardona *et al.*, 2020), colonias más pequeñas con menor tiempo de desarrollo, menor tiempo de desarrollo de la reina y un ciclo reproductivo más corto (Smith 1960; Fletcher 1977a,b, 1978; Winston *et al.*, 1981, 1983; Rinderer, 1987; Danka *et al.*, 1992; Schneider & McNally, 1992; Winston, 1992; Vergara *et al.*, 1993; Hepburn & Radloff, 1998; Otis *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004; Villaneuva & Roubik, 2004; Moritz *et al.*, 2005; Guzmán-Novoa *et al.*, 2011a). Por su parte, los resultados obtenidos por Acevedo-Gonzalez *et al.* (2019) sugieren que una mayor diversidad genética de abejas africanizadas gentiles, generadas por la hibridación de las poblaciones, puede permitir un ajuste más eficiente frente a los cambios ambientales respecto de las poblaciones europeas. A la luz de la introgresión cada vez mayor de genes africanos en las poblaciones de abejas del país, es necesario tanto evaluar las características que pueden ser seleccionadas para la producción, que permitirían una mejor adaptación regional y un mejor dominio de los ecotipos presentes en el país, como establecer programas que permitan la conservación del acervo genético local de la especie.

Por otra parte, pese a ser considerada benéfica y con un importante rol como polinizadores de cultivos esenciales para la seguridad alimentaria del planeta y otros servicios ecológicos (Espregueira Themudo, 2020), *A. mellifera* es una especie exótica para el continente americano y altas densidades poblacionales presentes en hábitats naturales pueden producir impactos negativos. Sumado a ello, la diversidad genética se encuentra bajo constante influencia del hombre a través de las prácticas apícolas (Leclercq *et al.*, 2018; Harpur *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2014; De la Rúa *et al.*, 2009) y debido a la selección de características preferidas para la actividad, la hibridación es inevitable (Uzunov *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2009; Nedic *et al.*, 2014; Eimanifar *et*

al., 2018, 2020; Bouga *et al.*, 2005; Susnik *et al.*, 2004), resultando en mezclas genéticas considerables entre las subespecies (Crewe *et al.*, 1994; Harpur *et al.*, 2012, 2013; De la Rúa *et al.*, 2009, 2013; Dogantzis *et al.*, 2021; Harpur *et al.*, 2015; Chapman *et al.*, 2016). En regiones donde se han introducido subespecies no nativas (Hatjina *et al.*, 2014), continuar con programas de conservación y mejoramiento que permitan asegurar la mantención de las especies nativas y los ecotipos adaptados localmente podría ser deseable. Sin embargo, actualmente existe controversia en torno a las estrategias de conservación de la diversidad de polinizadores, ya que estudios recientes proponen que existen intereses socioeconómicos y preferencias productivas que priman sobre la conservación (Lodesani *et al.*, 2003; De la Rúa *et al.*, 2009; Meixner *et al.*, 2010) y que la presencia masiva de colonias productivas introducidas, debe ser regulada en áreas protegidas para la conservación de abejas nativas (Thomson, 2016; Geslin *et al.*, 2017; Mallinger *et al.*, 2017; Geldmann & González-Varo, 2018; Henry & Rodet, 2018; Norfolk *et al.*, 2018; Requier *et al.*, 2019, 2020; Adjlane *et al.*, 2020).

De acuerdo con Buchler *et al.* (2014), la interacción entre el genotipo y el ambiente es un indicador de adaptaciones locales y *fitness*, y la conservación de la diversidad genética en las poblaciones de abejas es importante para preservar su gran adaptabilidad en diferentes zonas.

De este modo, Randi (2008) propone que debe priorizarse la conservación de las abejas con adaptaciones exitosas a regiones ecológicas particulares. Por otra parte, las colonias silvestres, como también los enjambres, se originan inicialmente a partir de colonias productivas y, aunque es esperable que estas poblaciones sigan un patrón de selección más neutral, su diversidad suele ser un espejo de ellas (Alburaki *et al.*, 2022). Por ello, estudiar la estructura genética de las poblaciones y su diversidad es la base del entendimiento de la biodiversidad y la conservación de las especies (Allendorf *et al.*, 2012). Así, la ampliación de los esfuerzos de investigación es necesaria para poder establecer más y mejores estrategias de conservación, adaptadas a cada una de las especies y regiones.

CAPÍTULO 2

Estado sanitario de las poblaciones de *A. mellifera* L. de Argentina.

-

Detección de *Varroa destructor*, virus ARN de cadena positiva, *Vairimorpha* spp. (= *Nosema* spp.), *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Ascosphaera apis* y análisis de su prevalencia en las cinco regiones productivas argentinas.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las colonias de abejas enfrentan numerosos desafíos. Uno de ellos es la potencial susceptibilidad a una amplia gama de patógenos comprendida por ácaros, virus, bacterias, protozoos, insectos, hongos y microsporidios (Lanutti *et al.*, 2022)(Figura 2.1). Gran parte de ellos presentan distribución mundial (Ellis *et al.*, 2005; Beurepaire *et al.*, 2020), y pueden solos o en asociación (Steinhauer *et al.*, 2018; Nanetti *et al.*, 2021), como el resultado de un ambiente particular o de las condiciones de la colmena, afectar la salud de los apiarios (Bordin *et al.*, 2022). Numerosas especies de polinizadores, entre ellos *A. mellifera*, han experimentado un drástico decrecimiento poblacional en las últimas décadas, que ha impactado negativamente en la producción mundial (Potts *et al.*, 2010; Hallmann *et al.*, 2017; Genchi García *et al.*, 2019; Requier *et al.*, 2020). La salud de las abejas melíferas ha sido una importante temática de estudio (Genersch *et al.*, 2010), y algunas hipótesis sugieren que ciertos patógenos podrían ser los responsables principales de las pérdidas masivas de colmenas alrededor del mundo (CoxFoster *et al.*, 2007; Rosenkranz *et al.*, 2010; McMenamin & Genersch, 2015; Brutscher *et al.*, 2016; Maggi *et al.*, 2016; Giacobino *et al.* 2016b; Meana *et al.*, 2017; Bordin *et al.*, 2022).

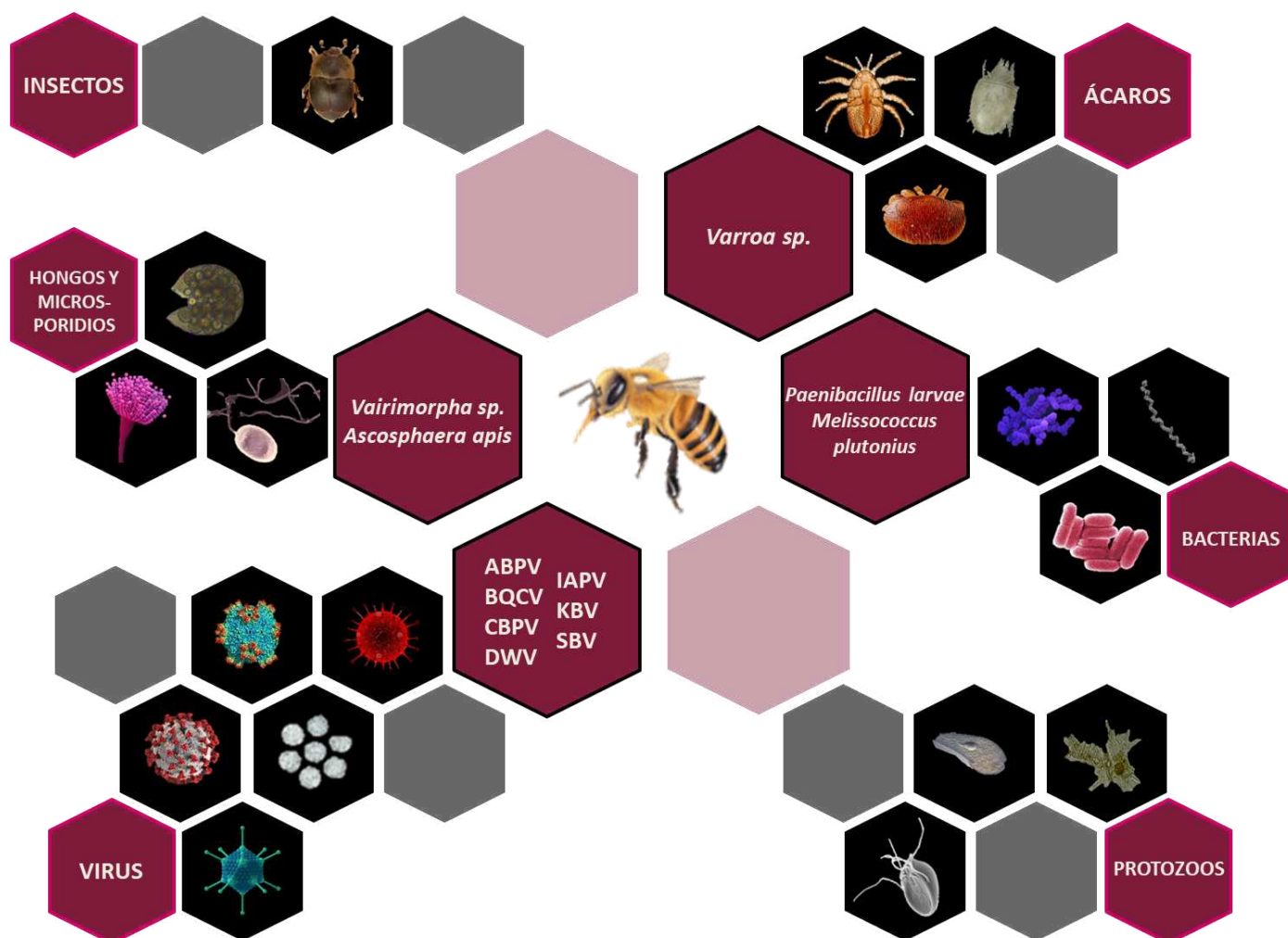


Figura 2.1 – Patógenos que afectan a las colonias de *A. mellifera*. Solo se encuentran individualizados en el centro de la figura, aquellos que son objeto de los análisis del presente capítulo.

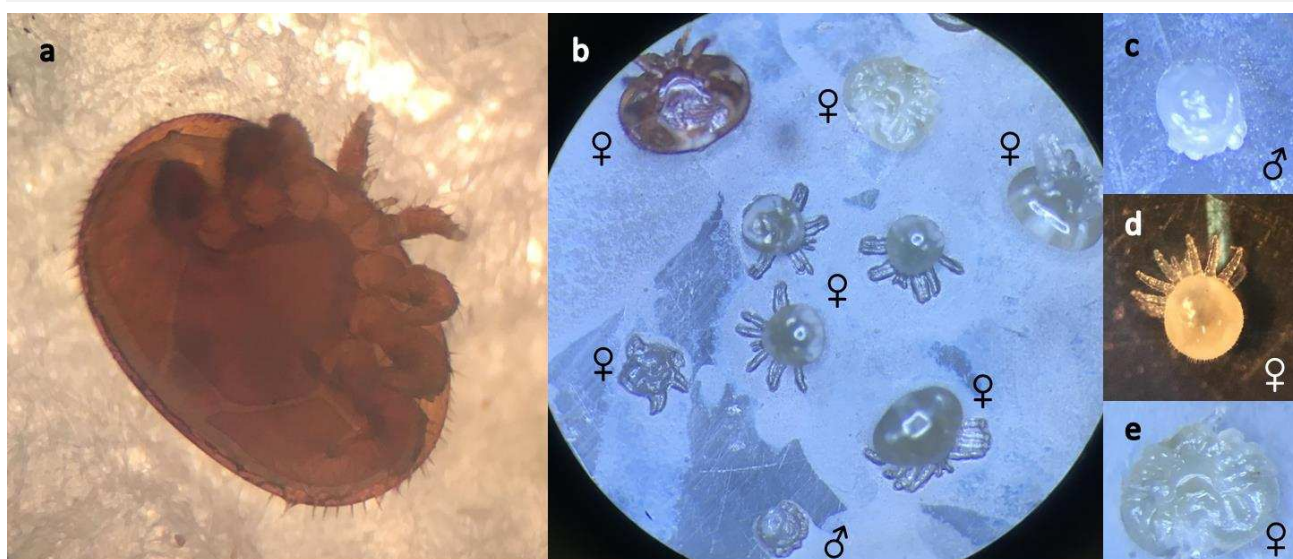
1.1. *Varroa destructor*

La dispersión de especies llevada a cabo por el hombre puede amenazar la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas, facilitando la diseminación de patógenos (Banks *et al.*, 2015; Tabak *et al.*, 2017). En este sentido *A. mellifera* ha experimentado una rápida expansión geográfica que se tradujo en la adquisición de nuevos parásitos y patógenos (Moritz *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2011), como el ácaro *Varroa* originariamente asociado a poblaciones de *Apis cerana* Fabricius, 1773 en Asia (Anderson & Trueman, 2000; Chantawannakul *et al.*, 2016; de Jong, 1982) que logró, a partir del salto de hospedador, su distribución mundial debido a la trashumancia (Rosenkranz *et al.*, 2010; Traynor *et al.*, 2020). Su aparición en Argentina se remonta a 1976, cuando fue detectado en la provincia de Formosa (De La Sota & Bacci, 2005). *Varroa* es uno de los géneros destacados entre los ácaros económicamente relevantes para la apicultura (Traynor *et al.*, 2020), siendo *V. destructor* la especie más importante (Anderson & Trueman, 2000). Es un ectoparásito cuyas hembras son ovaladas de color rojo-cobrizo, mientras que los machos y las larvas son blanquecinos y más pequeños (Dieteman *et al.*, 2013)(Figura 2.2). Su ciclo de vida comprende dos fases: una reproductiva, sincronizada con el ciclo de desarrollo del hospedador, durante la que infesta individuos inmaduros y una forética, de dispersión, durante la que parasita abejas adultas (Traynor *et al.*, 2020). Su reproducción depende directamente de la fase de pupa de su hospedador (Martin, 1995), comenzando su ciclo de vida con el ingreso de una hembra grávida –fundadora- en una celda pronta a ser operculada, que pone huevos dando lugar al desarrollo de un macho haploide y 4 o 5 hembras diploides (Martin, 1995). Tanto la hembra fundadora como su descendencia, se alimentan del cuerpo graso y la hemolinfa de la pupa (Ramsey *et al.*, 2019). El macho se cruza con sus hermanas y cuando emerge la abeja adulta, todas las hembras fecundadas (fundadora y descendencia) colonizan nuevas celdas y reinician el ciclo reproductivo (Rosenkranz *et al.*, 2010; Dieteman *et al.*, 2013; Traynor *et al.*, 2020). Cada ciclo reproductivo se encuentra separado por algunos días de fase forética, presentando alrededor de una docena de generaciones por año (Rosenkranz *et al.*, 2010; Beaurepaire *et al.*, 2017). Aunque puede causar la muerte de larvas y pupas, generalmente los individuos sobreviven a expensas de su expectativa de vida, su tamaño, el desarrollo de las alas y la habilidad de vuelo, el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y la capacidad de orientación (Fuchs & Langenbach, 1989; Ruano *et al.*, 1991). La enfermedad conocida como varroasis es una de las mayores amenazas para la producción apícola en todo el mundo (Martin, 2001; Carreck *et al.*, 2010), y ha sido asociada con la mortalidad de colonias (vanEngelsdorp *et al.*, 2008; Currie *et al.*, 2010; Dahle *et al.*, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2010; Rosenkranz *et al.*, 2010; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010), por lo que la determinación de los niveles de infestación es una práctica rutinaria entre los apicultores en todo el mundo (Sammantaro *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2010; Dietemann *et al.*, 2013; OIE, 2021).

En adición al debilitamiento e inmunosupresión que provoca el parasitismo sobre las abejas (Alaux *et al.*, 2011; Ramsey *et al.*, 2019), las heridas que realiza para alimentarse constituyen posibles sitios de entrada para otros

patógenos (Ball, 1988; Bailey & Ball, 1991; Shen *et al.*, 2005a), mientras actúa como vector mecánico y biológico de virus que causan daños significativos en su salud (Antúnez *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005; Boecking & Genersch, 2008; Highfield *et al.*, 2009; Forsgren *et al.*, 2009; Genersch *et al.*, 2010; Genersch & Aubert, 2010; Nazzi *et al.*, 2012; Dainat *et al.*, 2012; Tehel *et al.*, 2016; Di Prisco *et al.*, 2016). Aunque estos virus se encuentren distribuidos globalmente y presenten alta prevalencia, su patogenicidad aumenta en infestaciones activas del ácaro (Tantillo *et al.*, 2015), facilitando y promoviendo su distribución (Lanutti *et al.*, 2022).

Figura 2.2 – Imágenes de *Varroa destructor* en distintos estados de desarrollo tomadas bajo lupa: a- *Varroa* hembra adulta forética; b- Proto y deutoninfas hembras con diferente grado de desarrollo y protoninfa macho, tomadas del interior de celdas de una colmena infestada; c- *Varroa* macho; d- Protoninfa hembra y e- Deutoninfa hembra.



Algunos de ellos han sido documentados tanto replicando dentro del ácaro como siendo vectorizados por él, o en su presencia (Martin *et al.*, 2001; Tentcheva *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Chantawannakul *et al.*, 2006; Santillán-Galicia *et al.*, 2010; de Miranda *et al.*, 2010; Di Prisco *et al.*, 2011; Daughenbaugh *et al.*, 2015; Giacobino *et al.*, 2016b; Martin & Brettell, 2019; Dittes *et al.*, 2020; Yañez *et al.*, 2020; Dubois *et al.*, 2020) y aunque están usualmente presentes en las colonias de forma latente, pueden volverse aparentes bajo condiciones adversas de *stress*, inmunosupresión o deficiencias nutricionales, dando lugar a infecciones de otros patógenos que pueden interactuar con ellos de manera sinérgica, aumentando su virulencia y debilitando a las colonias (Yang *et al.*, 2005; Tantillo *et al.*, 2015; Di Prisco *et al.*, 2016; Castelli *et al.*, 2021; Lanutti *et al.*, 2022).

1.2. Virus ARN de cadena positiva

Los virus son parásitos intracelulares obligados (Salina *et al.*, 2021) formados por una molécula de ácido nucleico cubierta por una proteína de envoltura o cápside (Adjlane *et al.*, 2017). Las infecciones que producen pueden clasificarse como sintomáticas o encubiertas según la presencia o ausencia de signos clínicos, siendo la ruta de transmisión más recurrente la horizontal (Schorkopf *et al.*, 2007; Bodden *et al.*, 2019). De acuerdo con

Beaurepaire *et al.* (2020) se detectaron alrededor de 70 virus infectando abejas en todo el mundo, diez de los cuales han sido registrados en Argentina (Allen & Ball, 1996; Reynaldi *et al.* 2010; 2011; Brasesco *et al.*, 2013; Sguazza *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2016; Molinari *et al.*, 2017; Quintana *et al.*, 2019; Fernández de Landa *et al.*, 2020; Brasesco *et al.*, 2020), siendo los Virus de la Parálisis Crónica (CBPV), Virus de las Alas Deformadas (DWV), Virus de la Cría Ensacada (SBV), Virus de la Parálisis Aguda (ABPV), Virus de Kashmire (KBV), Virus de la Parálisis Israelí (IAPV) y Virus de las Celdas Reales Negras (BQCV) frecuentemente detectados en asociación con pérdidas económicas alrededor del mundo (Mockel *et al.*, 2011; Adjlane & Haddad, 2014; Fürst *et al.*, 2014; Tantillo *et al.*, 2015; Gisder *et al.*, 2017; McMenamin *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019; Lanutti *et al.*, 2022). Los virus antes nombrados presentan ARN como ácido nucléico (revisado en Salina *et al.*, 2021), se encuentran entre los agentes causales de enfermedades más diversos, por su alta frecuencia de mutación (Kevill *et al.*, 2017; Domingo *et al.*, 2012, 2019; Dolan *et al.*, 2018) y gran distribución (Shi *et al.*, 2016; Mihara *et al.*, 2018), siendo más perjudiciales aquellos que contienen ARN de cadena positiva (Lin *et al.*, 2023a).

Pese a haber sido el primer virus de abejas aislado, descripto (Bailey *et al.* 1963) y con distribución mundial (Genersch *et al.*, 2010), CBPV continúa aún sin asignación taxonómica (ICTV, 2023). Este virus puede infectar abejas de todas las castas y estados de desarrollo (Adjlane & Haddad, 2017) y presentar signos como temblor de las alas y el cuerpo, alas dislocadas, pérdida de la habilidad de vuelo, abdomen distendido o hinchado, abejas que se arrastran, parálisis (Bailey *et al.*, 1963; Ball & Bailey, 1997; Chen & Siede, 2007) o abejas oscuras, con un aspecto graso y brillante (Rinderer & Rothenbuhler, 1976; Ball, 1999). Además, produce el debilitamiento de la colmena por pérdida masiva de obreras (Dittes *et al.*, 2020), que generalmente se encuentran muertas en la entrada de la piquera.

Los virus DWV y SBV pertenecen a la familia Iflaviridae (ICTV, 2023). DWV es una de las principales infecciones que afectan a las colonias de abejas (Lanutti *et al.*, 2022), sin distinción de castas ni estados de desarrollo (Allen & Ball, 1996; Tentcheva *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2012; Anguiano-Baez *et al.*, 2016) y es considerado uno de los virus más dañinos (Mockel *et al.*, 2011; Adjlane & Haddad, 2014). Puede llevar a cabo infecciones encubiertas (Chen *et al.*, 2006a, 2006b; Genersch, 2010; Schöning *et al.*, 2012) o presentar signos como alas deformadas (Figura 2.3) y el abdomen hinchado, acompañados de la reducción en la expectativa de vida y, en algunos casos, la muerte (Tentcheva *et al.*, 2006; Brettell *et al.*, 2017).



Figura 2.3 – Abejas adultas con alas deformadas provenientes de colmenas positivas para DWV. Fotografías tomadas en el apiario experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP.

Mientras que sólo pueden observarse adultos con alas deformadas cuando la infección se da en estados tempranos de desarrollo, este signo clínico no es evidente cuando la infección se produce en estado adulto, aunque las abejas sufren una reducción en su expectativa de vida frente a infecciones agudas. Numerosas vías de transmisión han sido descriptas, entre las que *V. destructor* funciona como un muy eficiente vector (Aronstein & Murray, 2010; Forsgren, 2010; Singh *et al.*, 2010; Nazzi *et al.*, 2012; Graystock *et al.*, 2013a; Peck *et al.*, 2016; Tehel *et al.*, 2019; Posada-Florez *et al.*, 2019; Bodden *et al.*, 2019; Yousefi & Fouks, 2019; Castelli *et al.*, 2021; Dalmon *et al.*, 2021; Yordanova *et al.*, 2022). Presenta tres variantes principales (DWV A, B y C – Dalmon *et al.*, 2017) y está registrado como el virus más prevalente en el país (Ding *et al.*, 2016; Brasesco *et al.*, 2020).



Figura 2.4 – Larvas de abejas obreras afectadas por SBV. Fotografías tomadas en el apiario experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP.

SBV fue descripto por White en 1913 como una virosis que afecta al estado larval y su primer reporte en Argentina fue en 1996 (Allen & Ball, 1996). Las larvas infectadas forman un saco por acumulación de líquido entre el cuerpo y la cutícula, que imposibilita la muda al estado de pupa (Bailey *et al.*, 1964 – Figura 2.4). Si bien, puede hallarse presente en abejas obreras adultas sin signos aparentes, disminuye su expectativa de vida (Chen & Siede, 2007) y se aloja principalmente en las glándulas hipofaríngeas (Mussen & Furgala, 1977), facilitando su dispersión a través de las abejas nodrizas que alimentan a las larvas (Shen *et al.*, 2005b). En la actualidad, es uno de los virus de mayor distribución en todo el mundo (Li *et al.*, 2019; Beaurepaire *et al.*, 2020) y según Dubois *et al.* (2020) podría formar parte del grupo de virus vectorizados por *V. destructor*.



Figura 2.5 – Larvas de abejas reinas afectadas por BQCV. Fotografías tomadas a partir de celdas reales enviadas por productores al Laboratorio de Virología – FCV, UNLP.

Los virus ABPV, KBV, IAPV y BQCV pertenecen a la familia Dicistroviridae (ICTV, 2023). Los primeros tres son considerados parte del complejo viral AIK por su estrecha relación filogenética (de Miranda *et al.*, 2010; King *et al.*, 2011). Presentan una signología similar, causando la mortalidad en abejas adultas, frecuentemente asociados a casos de pérdidas de colmenas (Cox Foster *et al.*, 2007). Las abejas pueden morir rápidamente sin mostrar signos de infección, sobre todo en presencia de *Varroa* (Allen *et al.*, 1986). ABPV fue identificado por Bailey *et al.* (1963) quienes describieron entre sus signos característicos los temblores y parálisis, mientras que Maori *et al.* (2007) observaron

inhabilidad para volar, ennegrecimiento gradual y pérdida de pilosidad previa a la muerte. Además, *Varroa* actúa como vector mecánico de este virus (Yañez *et al.*, 2020). KBV fue reportado por primera vez en 1974 (Bailey & Woods, 1977). Si bien no presenta signos característicos, suele hallarse asociado al descenso abrupto de la población adulta de la colonia con una consecuente aparición de enfermedades en larvas y pupas (Hornitzky, 1987; Todd *et al.*, 2004; Ribière *et al.*, 2008). Ha sido registrado recientemente en Chile y Brasil (Riveros *et al.*, 2018; Guimarães-Cestaro *et al.*, 2024), aunque no ha sido reportado en otros países de América del Sur (Maggi *et al.*, 2016). IAPV fue aislado por primera vez en muestras que mostraban signos similares a los causados por ABPV (Maori *et al.*, 2007). Es una infección que generalmente es hallada de forma subclínica con bajo título viral, aunque suministrado con el alimento o inoculado puede ser muy virulento (Maori *et al.*, 2007; Ribière *et al.*, 2008). Ha sido citado para Argentina en alta prevalencia (Reynaldi *et al.*, 2011).

BQCV ha sido hallado en gran proporción en colonias en colapso (Berényi *et al.*, 2006; Runckel *et al.*, 2011) y fue reportado por primera vez en Argentina por Sguazza *et al.* en 2013. Es uno de los virus más prevalentes que afecta principalmente el desarrollo de las larvas y pupas reales (Bailey & Ball, 1983)(Figura 2.5) y, aunque no causa signos o infección evidente en abejas obreras adultas, se mantiene de forma crónica entre ellas por transmisión horizontal a partir del suministro de alimento por parte de las abejas nodrizas desde celdas infectadas hacia las larvas sanas (Tentcheva *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006a) o por transmisión vertical, desde la reina a los huevos. Afecta principalmente a los criadores de reinas (De Grandi-Hofman *et al.*, 2013), sin embargo, altas cargas virales pueden comprometer la capacidad de orientación de las abejas, aumentando la deriva (Retschnig *et al.*, 2019).

1.3. *Vairimorpha* spp. (=Nosema spp.)

Entre los patógenos que afectan a las abejas, los hongos coexisten con ellas abarcando un sinfín de posibilidades de interacción, pudiendo contrarrestar sus barreras inmunes y comportamientos de defensa (Nicoletti & Becchimanzi, 2022) con gran éxito debido a la resistencia a cambios ambientales y producción de esporas (Islam *et al.*, 2021). Tanto el ascomycete *Ascosphaera apis* como los microsporidios *Vairimorpha* spp. son importantes por su potencial nocivo para las abejas y la apicultura (Jensen *et al.*, 2013; Fries *et al.*, 2013).

El recientemente reclasificado *Vairimorpha* spp. (ex *Nosema* spp.)(Tokarev *et al.*, 2020), es uno de los patógenos más prevalentes, registrado a nivel mundial (Bailey, 1981; Bailey & Ball, 1991; Matheson, 1993; Matheson, 1996; Higes *et al.*, 2006, 2013b; Chauzat *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007, 2018; Chen *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008; Yoshiyama & Kimura, 2011; Guzman Novoa *et al.*, 2011; Fries *et al.*, 2013; Corradi & Selman, 2013; Han *et al.*, 2017; Grupe & Quandt, 2020). Originariamente descrito en *A. cerana* (Fries *et al.*, 1996), el género *Vairimorpha* es actualmente hallado en múltiples especies (Higes *et al.*, 2006; Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009a; Plischuk *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2011; Botías *et al.*, 2013; Graystock *et al.*, 2013b; Arbulo *et al.*, 2015; Bravi *et al.*, 2019; Genchi García *et al.*, 2019). Particularmente *A. mellifera* puede ser infectada por tres especies, *V. apis* (Zander, 1909; Fries *et al.*, 1993;

Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009b; Higes *et al.*, 2013b), *V. ceranae* (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009b; Botías *et al.*, 2012; Higes *et al.*, 2013b) y el recientemente descrito *V. neumani* (Chemurot *et al.*, 2017). Este género pertenece al phylum de los microsporidios que comprende parásitos intracelulares obligados, comunmente encontrados en insectos, entre otras especies de animales (Mathis 2000; Keeling & Fast, 2002; Franzen 2008; Troemel & Madhani, 2011). Presenta un importante rol en la salud de las abejas (Higes *et al.*, 2008; Emsen *et al.*, 2020; Jabal-Uriel *et al.*, 2022) y en los sistemas ecológicos (Bojko *et al.*, 2022a, 2022b; Chauvet *et al.*, 2022), ya que han experimentado evolutivamente una reducción en sus genomas y proteomas, resultando en la dependencia metabólica de su hospedador (Corradi & Selman, 2013; Nakjang *et al.*, 2013; Wiredu-Boakye *et al.*, 2017; Dean *et al.*, 2016, 2018). Su fisiología les confiere características específicas, incluyendo el potencial de permanecer latentes por muchos años (Kotkova *et al.*, 2013) y enmascararse frente al sistema inmune del hospedador (Reinke *et al.*, 2017). Las especies de *Vairimorpha* son responsables de la enfermedad conocida como nosemosis, que parasita las células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas (Fries *et al.*, 1996; OIE, 2024). Presentan la capacidad de formar esporas (Galajda *et al.*, 2021), que conforman el estado infectivo y son las únicas que pueden sobrevivir fuera de la célula hospedadora (Zander *et al.*, 1984; Fries *et al.*, 1996). Cada espora (Figura 2.6), contiene un esporoplasma –material infectivo- rodeado por una membrana y dos paredes extracelulares, y otras estructuras, como el tubo polar, necesarias para el proceso de infección de las células hospedadoras (Keohane *et al.*, 1999; Galajda *et al.*, 2021). Luego de ser ingeridas, las esporas llegan al ventrículo del hospedador para completar su ciclo de reproducción en el que extruyen el tubo polar y perforan la pared de las células epiteliales intestinales para inyectar su esporoplasma en ellas y así generar nuevas esporas, sin que el hospedador identifique al parásito (Gisder *et al.*, 2011).

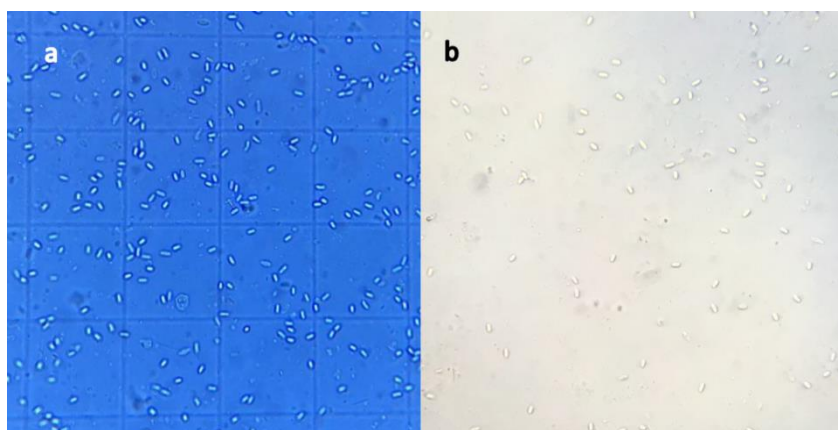


Figura 2.6 – Esporas de *Vairimorpha* spp. en macerados de intestinos de abejas adultas. Imágenes tomadas bajo microscopio óptico con objetivo de aumento 400x: a- con filtro de luz azul; b- sin filtro de luz azul.

De esta manera se extiende la infección entre las células del intestino produciendo daños tisulares severos (Higes *et al.*, 2007; Garcia-Palencia *et al.*, 2010; Maiolino *et al.*, 2014; Panek *et al.*, 2018). Millones de nuevas esporas pueden hallarse en el intestino de una abeja infectada luego de algunas semanas de la infección inicial (Bailey & Ball, 1991) y aquellas que son excretadas con las heces se convierten en nuevas fuentes de infección en la colonia, pudiendo mantener la capacidad infectiva por más de un año (Fries, 1993). Parasita a todas las

castas y edades de abejas (Higes *et al.*, 2009; Traver & Fell, 2011a, 2011b; Martin-Hernandez *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017) aunque es más prevalente en abejas pecoreadoras (Smart & Sheppard, 2012; Botias *et al.*, 2013; Jack *et al.*, 2016; Jabal-Uriel *et al.*, 2022). Su transmisión se da principalmente por la ruta fecal-oral (Higes *et al.*, 2007; Goblirsch *et al.*, 2018; Blot *et al.*, 2023). Las abejas adultas ingieren las esporas a partir de miel, polen o agua contaminados (L'Arrivee *et al.*, 1965; Bailey *et al.*, 1991; Higes *et al.*, 2008; Giersch *et al.*, 2009; Formato *et al.*, 2022), por trofalaxis (Webster *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 2012) o durante la actividad de forrajeo, limpieza de la colmena y *grooming* (Bailey, 1955; Chen *et al.*, 2008; Gisder *et al.*, 2012; Martin-Hernandez *et al.*, 2018). Además, las glándulas hipofaríngeas, mandibulares y salivales tienen un rol importante en el procesamiento del alimento y la alimentación tanto de la reina como de las larvas, sugiriendo que podrían ser un vehículo para la transmisión horizontal del patógeno (Shen *et al.*, 2005b; Chen *et al.*, 2006a, 2009a; Singh *et al.*, 2010; Copley *et al.*, 2011).

Aunque las abejas infectadas no exhiben síntomas externos, la nosemosis produce desordenes digestivos, un acortamiento de la esperanza de vida (Higes *et al.*, 2007; Goblirsch *et al.*, 2013; Vidau *et al.*, 2014) y disminución del número de abejas en la población de la colmena (Hassanein, 1953; Rinderer & Sylvester, 1978; Malone *et al.*, 1995; Higes *et al.*, 2010; Botias *et al.*, 2013; Bravo *et al.*, 2014; Simeunovic *et al.*, 2014; OIE, 2024). Además, compete con su hospedador por energía y nutrientes y causa lesiones en el intestino propiciando una respuesta inmune inflamatoria (Castelli *et al.*, 2020), causando un abdomen hinchado que limita la absorción de nutrientes, incrementa la demanda de energía y puede causar disentería (Fernandez *et al.*, 2007; Mayack & Naug, 2009, 2010; Fries 2010; OIE, 2024). En combinación con estresores ambientales puede llevar al debilitamiento de las abejas y a largo plazo de la colonia (Goblirsch, 2018; Vejnovic *et al.*, 2018). Por otra parte, ha demostrado inducir múltiples alteraciones fisiológicas y comportamentales en los individuos afectados (Higes *et al.*, 2013b; Goblirsch *et al.*, 2018; Martín-Hernández *et al.*, 2018) incluyendo procesos involucrados en la regulación de la muerte celular programada (Higes *et al.*, 2013a; Kurze *et al.*, 2015, 2018; Doublet *et al.*, 2017; Martin-Hernandez *et al.*, 2017), el metabolismo energético (Mayack & Naug, 2009; Vidau *et al.*, 2014; Grozinger *et al.*, 2015; Kurze *et al.*, 2016a), la modulación del sistema inmune (Antúnez *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2018), la alteración del polietismo y el forrajeo prematuro (Dussaubat *et al.*, 2013; Lecocq *et al.*, 2016), el cese de la puesta de huevos en reinas infectadas (Schmid-Hempel *et al.*, 1998), envejecimiento prematuro de la población (Veselý *et al.*, 2003), vibración del cuerpo (Fries *et al.*, 2013), comportamientos que aumentan la temperatura del nido como forma de inmunidad social, desordenes hormonales (Vidau *et al.*, 2014) y pérdida de la capacidad de vuelo (Botías *et al.*, 2013).

La enfermedad resulta en el decrecimiento de la producción, la actividad forrajera y consecuentemente la reducción de la polinización (Goodwin *et al.*, 1990; Anderson & Giacon 1992; Higes *et al.*, 2008; Antunez *et al.*, 2009), pudiendo causar grandes daños económicos a la industria apícola (Martin Hernandez *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008). Ha sido ampliamente documentada en climas tropicales, subtropicales y templados (Martín-Hernández *et al.*, 2018; Grupe & Quandt, 2020, Pacini *et al.*, 2021). Se ha asociado con el colapso de colonias

(Higes *et al.*, 2008, 2010; Villa *et al.*, 2013; Bekele *et al.*, 2015; Adjlane & Haddad, 2016; Giacobino *et al.*, 2016a; Maggi *et al.*, 2016; Antúnez *et al.*, 2017; Requier *et al.*, 2018; Molineri *et al.*, 2018; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Schüler *et al.*, 2023) y usualmente se encuentra relacionada a infecciones virales producidas por BQCV, el virus Y, y el virus filamentoso (Fries *et al.*, 2013), siendo significativamente más dañino en coinfecciones con BQCV (Chen *et al.*, 2007).

1.4. *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*

Ascosphaera apis (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir es un hongo patógeno heterotático compuesto por hifas septadas hialinas perteneciente a la familia Ascosphaeraceae. Fue originariamente descrito por Maassen en 1913 como *Pericistis apis*, luego reclasificado por Claussen en 1921 y finalmente por Spiltoir & Olive que introdujeron el nombre del género *Ascosphaera* en 1955 (Spiltoir & Olive, 1955).

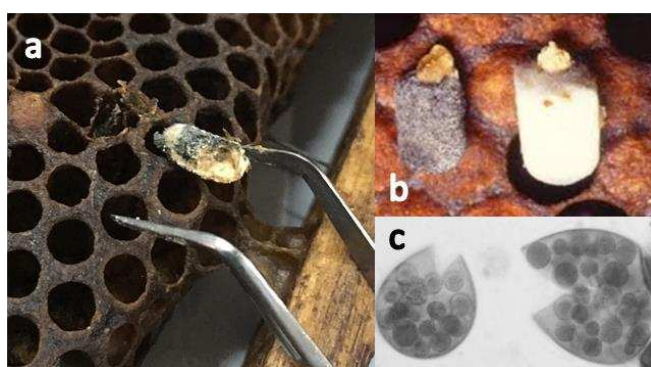


Figura 2.7 – Larvas de abejas obreras infectadas por *Ascosphaera apis*: a y b- Imágenes de momias (fotografía b cortesía de la Dra. Albo); c- Cuerpos fructíferos de *A. apis*, característicamente esporocistos esféricos que contienen esporas (tomada de Reynaldi *et al.*, 2015).

La detección molecular permitió diferenciar 4 especies que infectan a las abejas, de las cuales solo *A. apis* tiene relevancia económica (Hornitzky, 2001; Murray *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005) siendo la que se ha encontrado presente en Argentina desde 1978 (Rossi & Carranza, 1980; Albo *et al.*, 2001), difundida en todas las zonas productivas del país (Reynaldi *et al.*, 2003). Actualmente puede hallarse en todo el mundo, debido a la trashumancia y a la presencia de esporas que pueden perdurar viables una decena de años. Produce una micosis invasiva, otorgándole a la cría de *A. mellifera*, un aspecto de tiza momificada, de dónde surge el nombre de la enfermedad, cría yesificada (Hornitzky, 2001). La infección ocurre cuando las larvas ingieren esporas presentes en el alimento que germina en el interior del intestino posterior dando origen a la etapa vegetativa del hongo (micelio), que invade la cavidad del cuerpo de la larva, resultando en su muerte y luego continúa creciendo hasta cubrir enteramente al organismo (Aronstein, 2010). Las larvas infectadas no presentan síntomas mientras la cría se encuentra abierta, aunque sus cuerpos aparecen aumentados de tamaño debido al desarrollo interno del hongo y de color blanco opaco. Posteriormente, la larva muere después de ser operculada la celda, se vuelve esponjosa y adquiere la forma de la celda, luego se seca y se endurece permaneciendo suelta en la misma celda en forma de yeso (momia) de color blanco o gris oscuro (Albo *et al.*, 2010)(Figura 2.7). Del mismo modo la infección puede darse a partir del contacto con la superficie corporal, permitiendo que germine el micelio e invada el cuerpo hacia el interior. Las momias pueden

encontrarse en los cuadros y piso de la colmena, en las cercanías de la piquera y en torno a ella (Gilliam *et al.*, 1997). Las infecciones son frecuentes durante la primavera debido a que el crecimiento de los hongos se ve favorecido en lugares fríos, húmedos y poco ventilados (Flores *et al.*, 1996, Borum & Ulgen, 2008), lo que hace más susceptible a la cría después del operculado, a las colonias que disponen de un número insuficiente de abejas adultas para incubar correctamente sus crías, a las que están creciendo o a aquellas que son pequeñas y tienen menor capacidad de producir calor. Las larvas de los zánganos son las más afectadas debido a que se hallan en la periferia de los panales de cría. Las esporas se acumulan en cera, polen y miel, que sirven como fuente de infección dentro de y entre las colmenas (Aronstein *et al.*, 2010; Evison, 2015). Si bien la infección se produce por acumulación de esporas, existen factores predisponentes que conducen al desequilibrio interno de la colmena facilitando la aparición de la enfermedad y su grado de severidad. La cría yesificada está distribuida mundialmente, aumentando su incidencia en la última década (Kluser & Peduzzi, 2007). Aizen *et al.* (2009) han demostrado que la actividad humana tiene gran influencia en esta tendencia. Esta enfermedad es responsable de causar daños y pérdidas significativas en términos de número de abejas y productividad de la colonia (Garrido-Bailon *et al.*, 2013), particularmente en combinación con otros patógenos como *V. apis* (Aydin *et al.*, 2006), *V. ceranae* y *V. destructor* (Hedtke *et al.*, 2011). Además, Cheng *et al.* (2022) han reportado que ABPV y CBPV pueden replicar dentro de *A. apis*.

Por otra parte, *A. mellifera* es susceptible a una gran variedad de enfermedades bacterianas que continúan siendo un gran problema para la actividad apícola por su gran capacidad infectiva (Milbrath, 2021), entre las que se destacan loque europea (EFB) y loque americana (AFB), causantes de daños económicos severos en todo el mundo (Matheson, 1993; Alippi *et al.*, 2004; Ellis & Munn, 2005; Wilkins *et al.*, 2007, Roetschi *et al.*, 2008; Ponce de León-Door *et al.*, 2018; Boncristiani *et al.*, 2021). Pertenecientes al phylum Firmicutes, fueron descritas por Schirach en 1769, aunque White en 1912 logró individualizarlas como dos enfermedades diferentes.

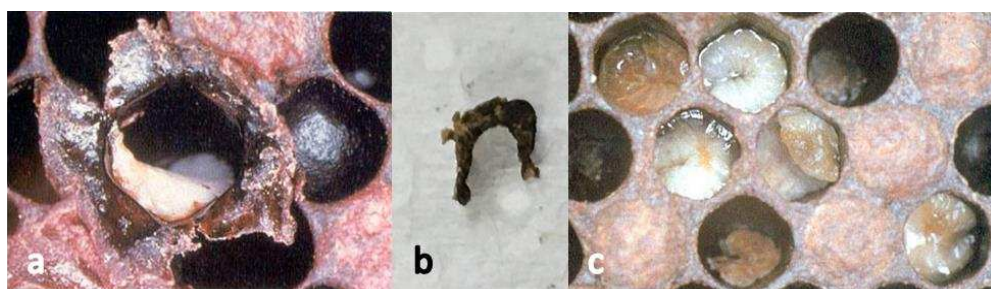


Figura 2.8 – Larvas de abejas obreras afectadas por EFB: a- larva enferma dentro de la celda; b- escama seca extraída de una colmena enferma; c- larvas enfermas en sus celdas (fotografías a y b tomadas en el apiario experimental de la Facultad de Ciencias Veterinarias, fotografía c cortesía de la Dra. Albo).

EFB es producida por la bacteria lanceolada anaerobia gram-positiva *Melissococcus plutonius* (Bailey, 1957, 1983, 1956; White, 1920), no formadora de esporas, con 37 variantes descritas actualmente (Okumura *et al.*, 2011; Arai *et al.* 2012; Haynes *et al.*, 2013; Budge *et al.*, 2014; Takamatsu *et al.*, 2014; Djukic *et al.*, 2018,

Ponce de León-Door *et al.*, 2018, Okumura *et al.*, 2018, Lewkowski & Erler, 2019; Okumura *et al.*, 2019) que difieren en su virulencia (Arai *et al.*, 2012, Lewkowski & Erler, 2019; Grossar *et al.*, 2020; Milbrath, 2021) y afectan principalmente a las larvas de *A. mellifera* (Bailey, 1956), *A. cerana* (Bailey, 1974) y, *A. laboriosa* (Allen, Ball & Underwood, 1990). Descrita en 1912 como *Streptococcus pluton*, reclasificada en 1982 como *M. pluton* y luego como *M. plutonius* (White, 1912; Bailey & Collins, 1982; Trüper & de Clari, 1998), su diagnóstico a campo es complicado ya que la enfermedad puede evidenciarse a partir de múltiples síntomas presentes en el estado larval con gran variabilidad en su gravedad, o ser asintomática (Forsgren *et al.*, 2005; Belloy *et al.*, 2007; Roetschi *et al.*, 2008; Budge *et al.*, 2010; O'Grady Milbrath *et al.*, 2021). Cuando los síntomas se encuentran presentes, el más evidente es la muerte de las larvas en sus celdas acompañada de una coloración marrón clara atípica (OIE, 2023b). EFB puede afectar a las larvas de obreras, zánganos y reinas una vez que la bacteria ingresa directamente por ingestión de alimento contaminado o indirectamente a través de las abejas nodrizas que limpiaron previamente la celda de una larva infectada (Milbrath, 2021). *Melissococcus plutonius* rápidamente se multiplica en las condiciones favorables que le ofrece el intestino de la larva infectada, compitiendo por los nutrientes con su hospedador (Kathe *et al.*, 2021). Su virulencia y patogenicidad se encuentran asociadas a la producción de una toxina que afecta las células intestinales (Forsgren *et al.*, 2013; Djukic *et al.*, 2018; Grossar *et al.*, 2020). Generalmente, las larvas infectadas son detectadas y removidas de sus celdas por las abejas nodrizas. Aquellas larvas infectadas que no son detectadas, retrasan su desarrollo, dejan de alimentarse y pierden su forma y color hasta transformarse en una masa semilíquida marrón que se seca formando una escama sin adherencia a la celda, conforme progresa la enfermedad (Forsgren, 2010; Djukic *et al.*, 2018; OIE, 2023b)(Figura 2.8), aunque no todas las larvas infectadas mueren. Algunas colonias pueden sobreponerse a la infección, mientras que otras se ven fuertemente debilitadas por la pérdida de cría causando un eventual colapso (Forsgren *et al.*, 2013), la pérdida de colonias (Ellis & Munn, 2005) y de manera indirecta impactando económicamente en la producción apícola y agrícola dependiente de la polinización (Laate *et al.*, 2020; Jordan *et al.*, 2021). *Melissococcus plutonius* es transmitida entre colonias por abejas obreras adultas infectadas que llevan la bacteria hacia la colmena, entre colmenas y entre apiarios (Belloy *et al.*, 2007; Erban *et al.*, 2017), por pillaje de miel contaminada o movimiento de materiales entre colmenas producto de la actividad apícola (Hornitzky & Smith, 1998; Mckee *et al.*, 2003; Forsgren *et al.*, 2005). La carga bacteriana en obreras adultas de colonias infectadas es usualmente alta (Erban *et al.*, 2017) siendo mayor en las obreras que se desempeñan como nodrizas respecto de las que se encuentran en la piquera (Roetschi *et al.*, 2008). Aunque sea una bacteria no esporulante, el material contaminado se mantiene infectivo durante largos períodos (Bailey, 1959, Bailey & Collins, 1982; Shimanuki & Knox, 2000, Forsgren *et al.*, 2013). Por otra parte, se han hallado altas prevalencias de EFB en larvas y adultos de colonias asintomáticas pero que se encontraban cercanas a otras que sí presentaban síntomas (Mckee *et al.*, 2003; Forsgren *et al.*, 2005; Belloy *et al.*, 2007; Roetschi *et al.*, 2008; Budge *et al.*, 2010; Erban *et al.*, 2017), y ha sido reportada en América del Sur

en Venezuela, Colombia, Brasil, Uruguay, Chile y Argentina (Invernizzi *et al.*, 2011; Haynes *et al.*, 2013; Maggi *et al.*, 2016; Tibatá *et al.*, 2018b).

AFB es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*, anaerobia facultativa gram positiva y formadora de esporas (Ash *et al.*, 1993; Heyndrickx *et al.*, 1996). Comprende 4 genotipos (Genersch *et al.*, 2006), de los cuales los más importantes epidemiológicamente han sido detectados en América (Alippi *et al.*, 2004; Ellis & Munn, 2005; Antúnez *et al.*, 2007; Morrissey *et al.*, 2015; Krongdang *et al.*, 2017), descritos por primera vez en Argentina (Alippi, 1992; Alippi *et al.*, 2004) y presentes en Brasil y Uruguay (Antúnez *et al.*, 2015; Maggi *et al.*, 2016). Solamente las esporas de *P. larvae* son capaces de producir la enfermedad (Tarr, 1937), pudiendo permanecer viables por años, incluso en condiciones extremas (Matheson & Reid, 1992; Shimanuki & Knox, 1991) dentro de la colmena, en la miel o en los materiales y equipos apícolas (OIE, 2023a). La incidencia de AFB varía temporal y espacialmente (Otten & Otto, 2005; Wilkins *et al.*, 2007b) y su dispersión se produce frecuentemente durante el pillaje (De Graaf *et al.*, 2001; Lindström *et al.*, 2008), aunque también puede ocurrir por intercambio de materiales en las colmenas (Shimanuki & Knox, 2000), cera que contenga esporas, alimentación con miel o polen contaminado (OIE, 2023a), transferencia de reinas infectadas (Shimanuki & Knox, 2000) y a nivel de colonia, por la enjambración de una colmena infectada (Fries *et al.*, 2006). Es la enfermedad bacteriana más severa y destructiva que afecta a *A. mellifera* (Brødsgaard *et al.*, 1998). Tiene incidencia en los primeros estadios larvales al ingerir alimento con esporas que germinan en el intestino, se multiplican, atacan a las células epiteliales intestinales y las atraviesan para invadir el hemocel (Woodrow & Gochnauer, 1941; Davidson, 1970; Bailey & Ball, 1991; Dancer & Chantawannakul, 1997; Alippi *et al.*, 2004; Hrabák & Martínek, 2007; Yue *et al.*, 2008; Ebeling *et al.*, 2017; Fünfhaus *et al.*, 2018) dispersando la infección por todo el cuerpo conduciendo a la larva a su muerte por septicemia. La larva se vuelve marrón, semilíquida, pegajosa y con olor putrefacto para finalmente secarse y formar una escama bien adherida a la celda, que contiene millones de esporas (Bailey & Ball, 1991, OIE, 2023a, 2023b). AFB afecta al estado larval (Hoage & Rothenbuhler, 1966; Bamrick, 1967), aunque las abejas adultas pueden actuar como transportadoras de esporas ya que estas solo pueden germinar en larvas de menos de 48hs de edad (Wilson, 1971b; Hitchcock *et al.*, 2019) debido al desarrollo de la membrana peritrófica, que retiene a las bacterias en el lumen del intestino (Davidson, 1970). AFB es una enfermedad socioeconómicamente muy importante y con significancia internacional, en tanto la principal vía de transmisión es la miel contaminada con esporas (Shimanuki & Knox, 2000; Alippi *et al.*, 2004). Por su gran importancia es una de las seis enfermedades listadas en el manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, ex OIE) y de notificación obligatoria (OIE, 2023a). Adicionalmente, ha sido reportada la vectorización de *P. larvae* por *Aethina tumida* (pequeño escarabajo de la colmena) (Schäfer *et al.*, 2010).

Por otra parte, estos patógenos han sido hallados en asociación a otras especies de insectos que comparten ambiente con abejas melíferas (Plischuk *et al.*, 2009, 2016; Singh *et al.*, 2010; Evison *et al.*, 2012; Reynaldi *et*

al., 2013; Lucia *et al.*, 2014; Fürst *et al.*, 2014; Maxfield-Taylor *et al.*, 2015; McMahon *et al.*, 2015; Gamboa *et al.*, 2015; Reynaldi *et al.*, 2015; Ueira-Vieira *et al.*, 2015; Sébastien *et al.*, 2015; Manley *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2016; Tehel *et al.*, 2016; Dolezal *et al.*, 2016; Plischuk *et al.*, 2017; Porrini *et al.*, 2017; Alvarez *et al.*, 2018; Bravi *et al.*, 2019; Susevich *et al.*, 2021). Estos hallazgos permitieron trazar la hipótesis del efecto de *spillover* entre especies que comparten ambiente y recursos (Tehel *et al.*, 2016; Dalmon *et al.*, 2021; Pislak-Osepek *et al.*, 2021), aunque sean filogenéticamente distantes a *A. mellifera* (Levitt *et al.*, 2013; Dobelmann *et al.*, 2020). La actividad de pecoreo/forrajeo representa un potencial riesgo de transferencia de patógenos desde y hacia otros polinizadores (Tehel *et al.*, 2016; Nanetti *et al.*, 2021), mientras que el hombre juega un papel importante en la facilitación y promoción de su dispersión (Lanutti *et al.*, 2022). Esta perspectiva aumenta la importancia de estos patógenos no sólo por su afección a las colmenas de abejas melíferas, sino también por la posibilidad de utilizar a otras especies como reservorios, llevando a su dispersión y propiciando la generación de enfermedades emergentes en otras especies.

El presente capítulo proporciona la detección de los 12 patógenos con mayor importancia para la producción apícola en el país, relacionados mundialmente con las pérdidas de colmenas. Los porcentajes de infestación por *V. destructor*, la detección de virus ARN y sus coinfecciones, la presencia de bacterias y hongos y la determinación de los niveles de infección por el microsporidio *Vairimorpha* spp., son analizadas para las diferentes regiones productivas del país, brindando una actualización de su prevalencia y del estado sanitario de las colonias productoras.

1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los porcentajes de infestación por *V. destructor*, los niveles de infección de *Vairimorpha* spp. y la presencia de virus ARN, *M. plutonius*, *P. larvae* y *A. apis* en las poblaciones productivas de abejas de Argentina y evaluar la distribución geográfica de los patógenos presentes.
2. Evaluar la implicancia de la presencia de patógenos en poblaciones de abejas melíferas en cada una de las regiones productivas del país.

1.6. HIPÓTESIS

1. Las poblaciones de abejas melíferas de Argentina albergan numerosos patógenos cuya, distribución depende principalmente de la naturaleza de los patógenos implicados y las características de la región en la que se encuentran.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras colectadas durante otoño y primavera 2016-2022 (colección y zonas de muestreo descriptos en el capítulo 1 y Figura 1.3) a partir de colmenas productivas, que no presentaban signología evidente de

ninguna de las enfermedades estudiadas, fueron analizadas para presencia de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV, SBV e IAPV, el ácaro *Varroa destructor*, las bacterias *Melissococcus plutonius* y *Paenibacillus larvae*, el hongo *Ascosphaera apis* y el microsporidio *Vairimorpha* spp. (ex *Nosema* spp.)(Tabla 2.1) a partir de técnicas macro, microscópicas y moleculares. Cada muestra colectada, se corresponde con una única colmena, considerada como una unidad de estudio. Luego de la colección, las muestras se almacenaron a -80°C para la correcta conservación previo a su análisis.

Región	Provincia	N° muestras	Linaje materno	<i>Nosema</i> sp.	<i>Varroa</i> sp.	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Melissococcus plutonius</i>	<i>Ascosphaera apis</i>	Virus
CENTRO	Buenos Aires	Cuenca del Salado	105	104	80	99	92	92	88
		Noroeste	38	38	37	38	38	38	19
		Delta	8	8	8	8	8	8	8
		Metropolitana	10	10	10	8	10	10	10
		Norte	11	11	11	11	11	11	11
		Sudoeste	33	33	33	33	33	33	27
	Entre Ríos	39	39	37	39	39	39	39	39
	Santa Fe	24	23	22	23	23	23	23	24
	Córdoba	41	41	41	41	41	41	41	41
NEA	Misiones	15	15	11	11	15	15	15	15
	Jujuy	4	4	4	4	4	4	4	4
NOA	Tucumán	5	5	5	5	5	5	5	5
	Catamarca	2	2	1	2	2	2	2	2
CUYO	San Luis	10	7	6	7	7	7	7	10
	Mendoza	19	19	19	19	19	19	19	19
PATAGONIA	La Pampa	18	18	16	18	18	18	18	13
	Río Negro	20	19	20	20	20	20	20	20
TOTAL		402	396	361	386	385	385	385	355

Tabla 2.1 – Número de muestras colectadas por provincia y región productiva. La provincia de Buenos Aires se encuentra dividida en las zonas productivas propuestas por la Unidad de Coordinación Apícola en 2009. Se encuentran resaltadas las columnas correspondientes a cada una de las enfermedades analizadas en este capítulo.

2.1. Detección y cuantificación de *Varroa*

La detección y cuantificación de *V. destructor* fue realizada para 386 muestras acorde a la metodología validada por la OMSA (OIE, 2021; de la Sota & Bacci, 2005) con modificaciones. Aproximadamente 300 abejas obreras adultas fueron colectadas por muestra, deslizando un frasco hacia abajo en ambos lados de 3 de los cuadros de la cámara de cría. Luego, a cada frasco se agregó 3 partes de agua, unas gotas de detergente y ½ parte de alcohol etílico 70%, que actúan como agentes tensioactivos, y se agitó vigorosamente para permitir la separación de los ácaros de la cutícula de las abejas. Posteriormente, la mezcla fue vertida sobre un doble tamiz. Mientras que el superior retuvo a las abejas, el tamiz inferior permitió recuperar los ácaros presentes en cada muestra. Tanto abejas como ácaros fueron contabilizados y el porcentaje de infestación fue estimado

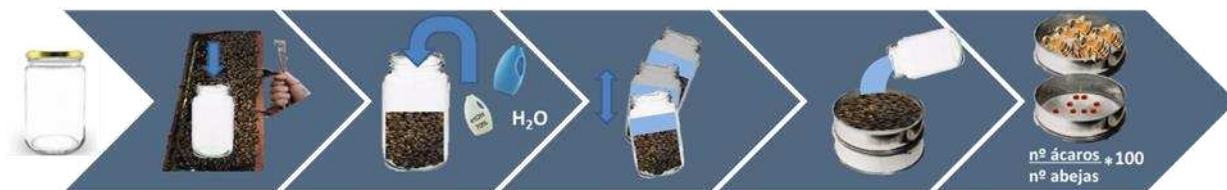


Figura 2.9 – Esquema de la prueba del frasco: metodología validada por la OMSA utilizada para cuantificación de *Varroa destructor*.

multiplicando por 100 el número de ácaros por abeja [(número de ácaros/número de abejas)*100 – Figura 2.9].

Los porcentajes de infestación se dividieron en niveles acorde a las detecciones más frecuentes y los porcentajes de ácaros foréticos que los productores apícolas consideran limitantes para la aplicación necesaria de acaricidas.

2.2. Detección de virus ARN

La detección de virus fue realizada sobre 355 muestras de acuerdo a Sguazza *et al.* (2013) con modificaciones. Quince abejas obreras adultas fueron colocadas en bolsas herméticas para homogeneización con 2 ml de buffer fosfato salino (PBS) estéril (libre de nucleasas). El macerado fue colocado en un tubo eppendorf® de 1,5ml para su clarificación por centrifugación en una microcentrífuga refrigerada (Sorvall™- ThermoFisher Scientific) a 13.300rpm durante 15 minutos. A continuación, se tomaron 200µl de sobrenadante, se agregaron 25µl de Proteinasa K (100µg/ µl – Inbio Highway®), se incubó durante 1 hora a 56°C y se centrifugó en microcentrífuga refrigerada a 13.300rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se colocaron 200µl de la muestra en un tubo eppendorf® de 1,5ml y se realizó la extracción y purificación del ARN viral con el kit *Viral Nucleic Acid Extraction Kit II* (Geneaid) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El ARN fue resuspendido en 50µl de agua ultrapura libre de nucleasas (sistema Milli-Q®) y su concentración y calidad medidas en un fluorómetro (Qubit®2.0, Invitrogen™) a partir de la cuantificación de microgramos (µg) de ARN extraído por microlitro de solución. Luego, se realizó la transcripción reversa del ARN utilizando la enzima *Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT, Promega) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, en termobloque seco y con 40ng de *random primers*, para sintetizar el ADN complementario (ADNc). Posteriormente, se realizó una PCR múltiple (mPCR) utilizando *primers* específicos para los 7 virus ARN analizados (Tabla 2.2), en un volumen total de 25µl, de los cuales 5µl correspondieron al ADNc sintetizado (0,5µg aproximadamente) y los 20µl restantes, a la mezcla compuesta por GoTaq®ADN polimerasa (5u/µl), GoTaq®buffer 5x, dNTPs 10mM, *primers* (2,25pM/µl) y agua ultrapura libre de nucleasas (sistema Milli-Q®), utilizando el perfil de temperaturas propuesto por Sguazza *et al.* (2013) -desnaturalización inicial a 95°C

Nombre	Virus	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Longitud del producto (pb)	Referencia
AIVf	IAPV	GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA	158	Sguazza et al. (2013)
IAPVr		GGGAGTATTGCTTTCTTGTGTG		
DWVf	DWV	TGGTCAATTACAAGCTACTTGG	269	Sguazza et al. (2013)
DWVr		TAGTTGGACCACTAGCACTCAT		
SBVf	SBV	CGTAATTGCGGAGTGGAAAGATT	342	Sguazza et al. (2013)
SBVr		AGATTCCTTCGAGGGTACCTCATC		
AIVf	ABPV	GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA	460	Sguazza et al. (2013)
ABPVr		ACTACAGAAGGCAATGTCCAAGA		
BQCVf	BQCV	CTTTATCGAGGAGGAGTTCGAGT	536	Sguazza et al. (2013)
BQCVr		GCAATAGATAAAGTGAGCCCTCC		
CBPVf	CBPV	AACCTGCCTCAACACAGGCAAC	774	Sguazza et al. (2013)
CBPVr		ACATCTCTTCTCGGTGTCAGCC		
AIVf	KBV	GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA	641	Diseñados por Sguazza GH.
KBVr		TGCACGGGAAGTATAAATAATTCT		

Tabla 2.2 – Secuencias de los *primers* utilizados para la detección de virus en las muestras analizadas y longitudes de fragmento de sus productos de amplificación.

durante 5 minutos, 40 ciclos de amplificación de 95°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos y, una extensión final a 72°C durante 5 minutos-. Adicionalmente, se utilizó un control negativo de reacción (para RT y mPCR) y controles positivos para virus obtenidos previamente a partir de muestras positivas (para mPCR).

El tamaño de los productos de amplificación y su correspondiente asignación a cada uno de los virus estudiados (Tabla 2.2) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% [0,8g agarosa/40ml de TBE1x (trisaminometano, ácido bórico, EDTA 0,5M pH=8)] teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV en transiluminador. Las asignaciones de los productos de amplificación permitieron evaluar infecciones simples y coinfecciones virales en el país y por región productiva.

2.3. Detección y cuantificación de niveles de infección por *Vairimorpha* spp.

La presencia y cuantificación de *Vairimorpha* spp. fue determinada a partir de la evaluación microscópica de esporas en homogenatos de intestinos de abejas pecoreadoras. Las esporas de las diferentes especies de *Vairimorpha* que afectan a las abejas son difíciles de distinguir microscópicamente por su gran similitud (Chen *et al.*, 2009b). Como el objetivo de esta determinación es evaluar la presencia del agente causal de la enfermedad, se cuantificó la presencia de esporas sin realizar distinción de especie.

Las muestras fueron tomadas en la piquera de la colmena, de modo de evitar coleccionar abejas jóvenes que tienen menos probabilidad de estar infectadas (OIE, 2024) y, posteriormente, conservadas a -20°C en alcohol etílico 70%. Se analizaron 361 muestras de acuerdo con la técnica propuesta por Cornejo & Rossi (1975). Se

Abundancia media de la muestra (esporas/ml)	Nivel de infección
0 – 10.000	DESPRECIABLE
10.000 – 100.000	MUY LEVE
100.000 – 600.000	LEVE
600.000 – 800.000	MEDIO
800.000 – 1.000.000	GRAVE
+ 1.000.000	MUY GRAVE

Tabla 2.3 – Niveles de infección para muestras positivas a *Vairimorpha* sp. Según el recuento de esporas/ml. Valoración propuesta por Cornejo y Rossi (1975).

extrajeron 35 intestinos por muestra y se trituraron en 7 ml de agua destilada estéril en un mortero, hasta alcanzar una pasta homogénea sin distinción de estructuras o tejidos particulares. Una gota del homogenato fue colocada en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y observada bajo microscopio óptico de campo claro con aumento x400, siguiendo la metodología reportada por Cantwell (1970), para cuantificar la abundancia media a partir del recuento de esporas/ml. Se contabilizó el número de esporas dentro de cinco

cuadrados grandes de la cámara incluyendo los bordes, sin tener en cuenta aquellas que se encuentran sobre los bordes superior y derecho, y se realizó el cálculo de esporas/ml multiplicando el número de esporas por el factor de dilución.

La clasificación de las muestras por niveles de infección se realizó de acuerdo a la escala de valoración propuesta por Cornejo & Rossi (1975 – Tabla 2.3).

2.4. Detección de bacterias y hongos

La detección de bacterias y hongos se realizó en 385 muestras acorde a las recomendaciones de la OMSA (OIE, 2012, 2023a, 2023b), a partir de la utilización de 10 abejas obreras adultas por colmena, mediante la técnica

de mPCR propuesta por Garrido-Bailón *et al.* (2013). Esta técnica permite amplificar el gen de ARN ribosómico (ARNr) 5.8S de *A. apis* y el gen de ARNr 16S de *M. plutonius* y *P. larvae* (Govan *et al.*, 1999).

Pese a ser enfermedades de la cría, la evaluación de la presencia de *A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius* en abejas adultas, ha presentado cantidades considerablemente mayores de esporas o de bacterias y hongos, que en el análisis de las larvas, indicando que aún en ausencia de síntomas clínicos de la enfermedad, pueden actuar dispersando agentes patógenos (Belloy *et al.*, 2007; Roetschi *et al.*, 2008) y, por ello, se ha demostrado que las abejas obreras adultas son apropiadas para análisis epidemiológicos (Lindström & Fries, 2005; Roetschi *et al.*, 2008).

La extracción de ADN se realizó de manera conjunta para los 3 patógenos colocando a las abejas en bolsas herméticas para homogeneización con 2ml de PBS estéril (libre de nucleasas), a partir del siguiente protocolo. La fase líquida del macerado fue colocada en un tubo eppendorf® de 1,5ml con 300µl de DNAzol®, incubado en termobloque seco a 60°C durante 20 minutos con agitación y colocado en un agitador de tipo vórtex por otros 10 minutos a temperatura ambiente, para garantizar la ruptura de las estructuras de resistencia por acción química y mecánica. Luego se centrifugó en microcentrífuga refrigerada a 13.000rpm por 5 minutos. Se preparó un tubo nuevo que contenía 200µl de DNAzol® al que se transfirieron 500µl del sobrenadante, homogeneizando suavemente la mezcla por pipeteo, previamente a ser centrifugado durante 10 minutos a 13.000rpm. Se tomaron 500µl del sobrenadante y se colocaron en un nuevo tubo, con igual volumen de alcohol isopropílico frío, para precipitar los ácidos nucleicos y separar las proteínas. Se mezcló por inversión del tubo y se incubó durante 15 minutos a -80°C para luego centrifugar la muestra durante 20 minutos a 13.000rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 200µl de alcohol etílico 70%, con agitación durante 10 segundos, para luego ser centrifugado durante 5 minutos a 13.000rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 15 a 20 minutos. Para resuspender el ADN, el pellet fue rehidratado con 100µl de agua ultrapura estéril libre de nucleasas (sistema Milli-Q®) y llevado a un termobloque seco durante 20 minutos a 60°C, con intervalos de agitación en un agitador de tipo vórtex para completar la disolución del pellet. La muestra se conservó a -20°C hasta su utilización. La eficiencia de las extracciones fue corroborada en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV en un transiluminador. Luego, se realizó la técnica de mPCR utilizando *primers* específicos (Tabla 2.4) y la reacción fue llevada a cabo en un volumen total de 25µl, de los cuales 3µl correspondieron al ADN de la muestra y, los 22µl restantes, a la mezcla compuesta por GoTaq®ADN polimerasa (5u/µl), GoTaq®buffer 5x, dNTPs 10mM, *primers* (con concentraciones de 0,09µM para *Ascos*; 0,6µM para *Meli* y 0,05 µM para *P.larvae*) y agua ultrapura libre de nucleasas (sistema Milli-Q®), utilizando el perfil de temperaturas descripto por Garrido-Bailón *et al.* (2013).

Nombre	Bacteria	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Longitud del producto (pb)	Referencia
MeliFOR	M. plutonius	GTAAAGGCGCTTCGGGT	281	Garrido-Bailón et al. (2013)
MeliREV		GAGGAAAACAGTTACTCTTCCCTA		
Primer 1	P.larvae	AAGTCGAGCGGACCTGTGTTTC	973	Govan et al. (1999)
Primer 2		TCTATCTCAAAACCGTCAGAGG		
Nombre	Hongo	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Longitud del producto (pb)	Referencia
AscFOR	A. apis	TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG	136	Garrido-Bailón et al. (2013)
AscREV		GCTAGCCAGGGGGAAGTAA		

Tabla 2.4 – Secuencias de los *primers* utilizados para la detección de bacterias y hongos en las muestras analizadas y longitudes de sus productos de amplificación.

Adicionalmente, se utilizó un control negativo de reacción (sin agregado de ADN) y controles positivos obtenidos previamente a partir de escamas de loque europea, una momia de cría yesificada y una larva infectada con loque americana a las que se les realizó el proceso de extracción de ADN descrito anteriormente con un paso previo de ruptura mecánica y agregado de Proteinasa K (200µg/µl) con incubación a 60°C para permitir mayor abrasión de estructuras de resistencia.

El tamaño de los productos de amplificación y la asignación a cada uno de los patógenos (Tabla 2.4) fue analizado a partir de electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV en un transiluminador.

3. RESULTADOS

3.1. Porcentaje de infestación por *Varroa*

Región	Provincia		Nº muestras	Varroa sp.	0%	0-1%	1-2%	2-3%	3-4%	4-5%	5-10%	10-15%	15-20%	>20%
CENTRO	Buenos Aires	Cuenca del Salado	105	99	45	29	9	8	2	-	3	-	1	2
		Noroeste	38	38	25	5	4	2	-	1	-	-	1	-
		Delta	8	8	3	2	2	-	-	-	1	-	-	-
		Metropolitana	10	8	1	3	1	-	2	-	-	1	-	-
		Norte	11	11	8	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sudoeste	33	33	22	4	3	1	-	-	1	-	-	2	
	Entre Ríos	39	39	22	4	2	1	1	2	4	-	1	2	
	Santa Fe	24	23	14	5	-	2	-	2	-	-	-	-	
	Córdoba	41	41	19	11	6	-	3	1	1	-	-	-	
NEA	Misiones	15	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NOA	Jujuy	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tucumán	5	5	-	-	3	1	1	-	-	-	-	-	
	Catamarca	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CUYO	San Luis	10	7	6	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
	Mendoza	19	19	8	4	3	2	-	1	1	-	-	-	
PATAGONIA	La Pampa	18	18	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Río Negro	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TOTAL			402	386	228	70	33	17	10	7	11	1	3	6

Tabla 2.5 – Número de muestras analizadas para detección y cuantificación de *Varroa* discriminadas por categorías de porcentaje de infestación (0%, 0-1%, 1-2%, 2-3%, 3-4%, 4-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, >20%) en cada región productiva y provincia muestreadas.

De las 386 colonias analizadas, en 228 (59,07%) no ha sido detectada la presencia de *Varroa*, mientras que en las restantes, los valores de infestación fueron superiores al 0,22%. Con el fin de ordenar el análisis, de acuerdo a los valores de cuantificación presentes en mayor frecuencia, se dividieron los resultados en 10

categorías conforme los resultados arrojados por la prueba del frasco: 0%, 0-1%, 1-2%, 2-3%, 3-4%, 4-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, >20% (siendo la categoría 0% la que contiene a las muestras en las que el ácaro no ha sido detectado, a diferencia de las categorías restantes que contienen las muestras con valores de infestación en el rango indicado, siendo 0%-1% la categoría con muestras que arrojaron cuantificaciones entre 0,1% y 1% y del mismo modo para las subsiguientes – Tabla 2.5).

Las primeras 5 categorías, con porcentajes de cuantificación entre 0% y 4%, concentraron la mayor parte de las muestras analizadas y se hallaron presentes en todas las regiones productivas, mientras que las restantes contenían sólo al 7,25% de las muestras en las que el ácaro fue detectado, aunque con valores de infestación muy elevados para la producción y supervivencia de las colonias presentes en la zona central del país, en las regiones CENTRO y CUYO. En las colonias analizadas para las regiones NEA y PATAGONIA no ha sido detectada la presencia del ácaro. A diferencia de ellas, CENTRO, CUYO Y NOA exhibieron valores de infestación entre 0,22% y 73,39%, presentando CENTRO Y CUYO las categorías de infestación más altas y los mayores porcentajes para presencia del ácaro. Las muestras comprendidas en la categoría 0-1% se hallaron en las zonas CUYO y CENTRO, representando entre un 15% y 22% de las muestras analizadas para cada región y un 18,13% para el total de muestras analizadas en el país.

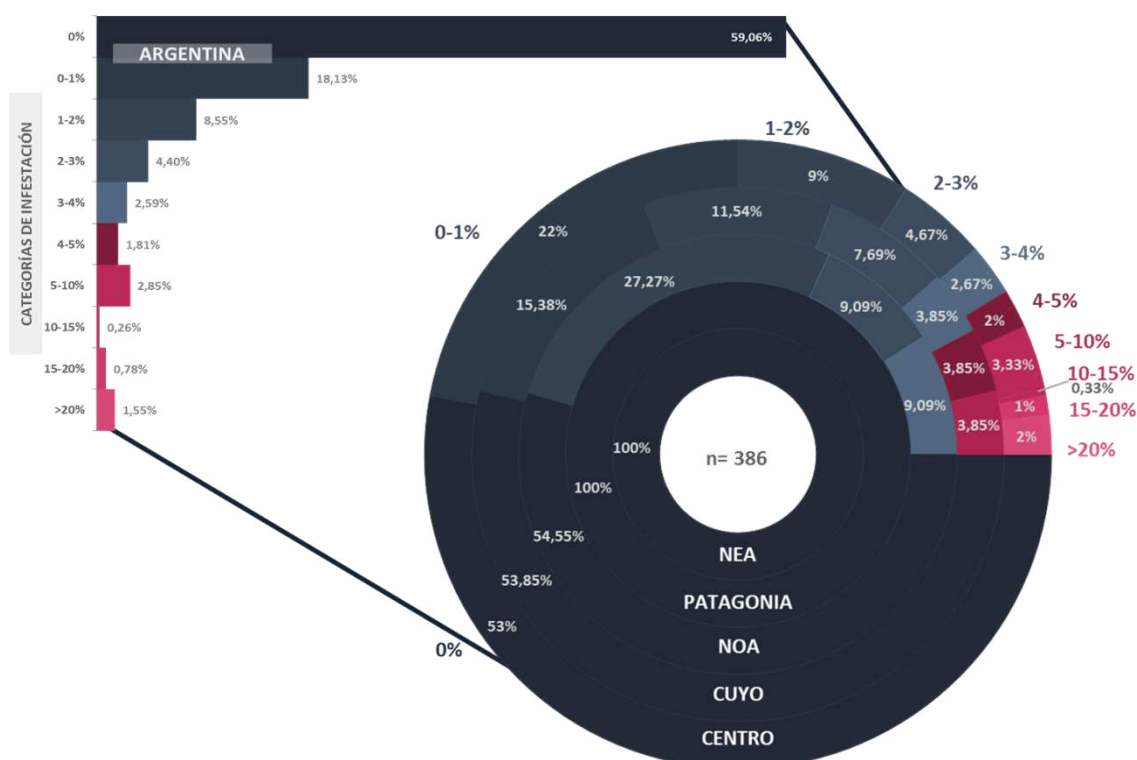


Figura 2.10 – Valores de porcentaje de infestación por *Varroa* medidos con la prueba del frasco. En el gráfico de barras se puede observar la distribución de la cuantificación a nivel nacional para cada una de las categorías (siendo la categoría 0% la que contiene a las muestras en las que el ácaro no ha sido detectado a diferencia de las categorías restantes que concentra las muestras con valores de infestación en el rango indicado). El gráfico de anillos muestra la distribución de los niveles de infestación por región productiva. La ubicación de los anillos se corresponde con las cuantificaciones realizadas por región, ubicándose más externamente las regiones con mayores porcentajes de infestación registrados e internamente, en las que no fue detectado el ácaro.

Tabla 2.6 – Cuantificaciones de *Varroa* con valores de infestación mayores al 10% en la región CENTRO.

Buenos Aires	Sudoeste	73,39%
		31,60%
	Cuenca del Salado	33%
		26,70%
		20%
		10%
	Norte	17,94%
Entre Ríos	Metropolitana	12%
		27,77%
		25%
		12,87%

Conforme lo esperado, a medida que aumenta el porcentaje de infestación, menor es la representación de cada categoría; sin embargo, las cuantificaciones de 5-10% en las regiones CENTRO y CUYO y >20% en la región CENTRO manifestaron una mayor representación a la esperada (Figura 2.10).

Mientras que los valores máximos de cuantificación para CUYO y NOA fueron de 6,81% y 3,18%, respectivamente, la región CENTRO fue la única que presentó valores de infestación mayores al 10%, particularmente en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos (listados por provincia en la Tabla 2.6), alcanzando cuantificaciones de 31,6%, 33% y hasta 73,39% en la provincia de Buenos Aires.

3.2. Detección de virus ARN de cadena positiva

En cuanto a la detección de virus, las muestras exhibieron presencia de estos patógenos en 136 de las 355 colonias analizadas, tanto en forma de infecciones simples como en co-infecciones (Figura 2.11).

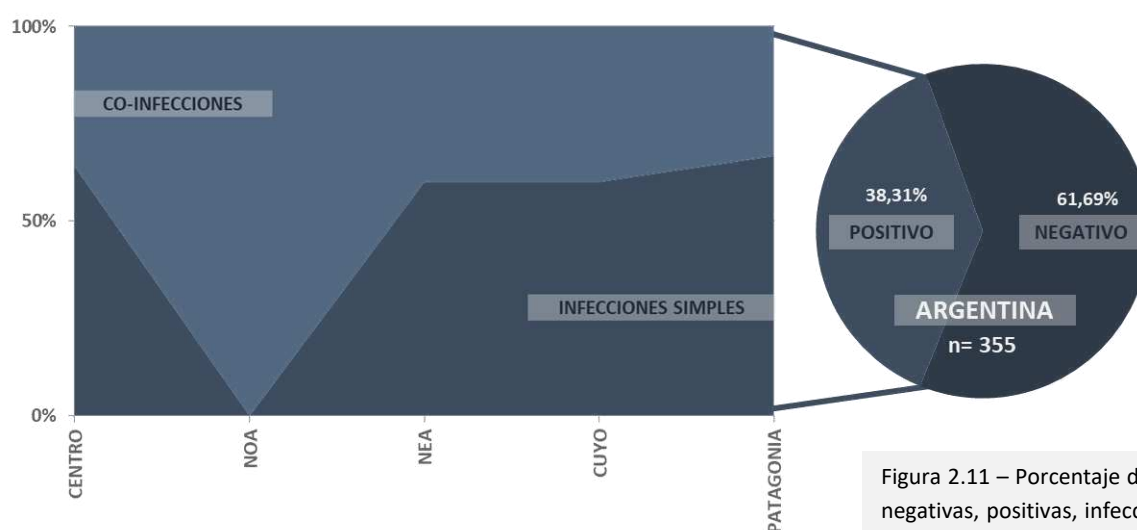


Figura 2.11 – Porcentaje de detecciones negativas, positivas, infecciones simples y co-infecciones para los virus ARN analizados en el país.

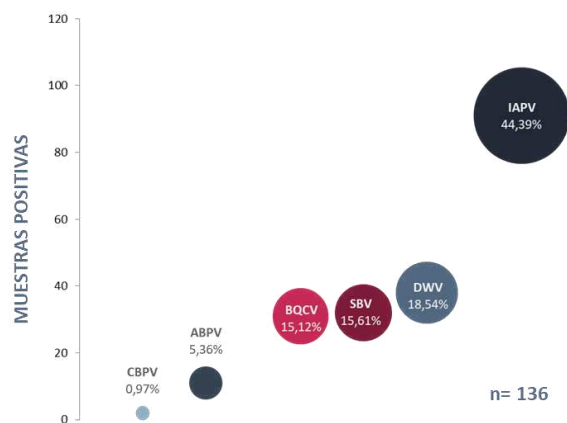
Todos los virus analizados se hallaron en el muestreo realizado, a excepción de KBV, el cual resultó negativo para el total de las colonias. Las 5 regiones productivas presentaron detecciones positivas para 2 o más virus, aunque en diferentes proporciones y con diversos arreglos de co-infecciones virales (Tabla 2.7; Figura 2.13). Particularmente, el porcentaje de infecciones simples fue mayor al 50% en CENTRO, CUYO, NEA y PATAGONIA, a diferencia de NOA, donde la presencia de virus se manifestó únicamente en forma de co-infecciones (Figura 2.11).

Región	Provincia	N° muestras	Virus	IAPV	DWV	ABPV	BQCV	CBPV	SBV	KBV
CENTRO	Cuenca del Salado	105	88	14	3	4	3	1	4	-
	Noroeste	38	19	1	-	-	1	-	2	-
	Delta	8	8	5	1	-	-	-	1	-
	Metropolitana	10	10	1	-	-	3	-	3	-
	Norte	11	11	6	-	-	-	-	-	-
	Sudoeste	33	27	10	1	-	-	-	-	-
	Entre Ríos	39	39	16	12	3	15	1	5	-
	Santa Fe	24	24	5	5	-	-	-	2	-
	Córdoba	41	41	15	3	-	3	-	4	-
NEA	Misiones	15	15	-	1	1	-	-	-	-
NOA	Jujuy	4	4	3	-	-	-	-	-	-
	Tucumán	5	5	2	2	-	-	-	-	-
	Catamarca	2	2	-	-	-	-	-	-	-
CUYO	San Luis	10	10	-	6	-	-	-	4	-
	Mendoza	19	19	6	1	-	5	-	-	-
PATAGONIA	La Pampa	18	13	1	3	-	-	-	2	-
	Río Negro	20	20	6	-	3	1	-	5	-
TOTAL		402	355	91	38	11	31	2	32	-

Tabla 2.7 – Detección de IAPV, DWV, ABPV, BQCV, CBPV, SBV y KBV en las muestras analizadas discriminadas por región productiva y provincia de muestreo, independientemente de su participación en infecciones simples o co-infecciones.

El virus más prevalente fue IAPV (con presencia en un 44,39% de las muestras positivas), seguido por DWV, SBV, BQCV, ABPV y CBPV, en orden decreciente de prevalencia (Figura 2.12). Mientras que IAPV, DWV, SBV, BQCV y ABPV fueron hallados tanto en infecciones simples (Figura 2.14) como en co-infecciones, se advirtió que CBPV está presente en baja prevalencia, y solamente en co-infecciones para la región CENTRO, específicamente en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos.

Figura 2.12 – Prevalencia de los virus presentes en Argentina, expresada en porcentaje, de acuerdo a la cantidad de detecciones positivas para las poblaciones muestradas. El tamaño de cada círculo representa el porcentaje de prevalencia de cada virus.



Cada región productiva presentó un perfil de infecciones virales diferentes, representado en la Figura 2.13. CENTRO fue la región que presentó mayor cantidad de virus (positivos), siendo la única en la que todos los virus detectados para el país han sido hallados, seguida en abundancia de infecciones por la región PATAGONIA, con 5 virus; CUYO, con 4; y, finalmente, NOA y NEA, con presencia de 2 virus ARN en sus poblaciones.

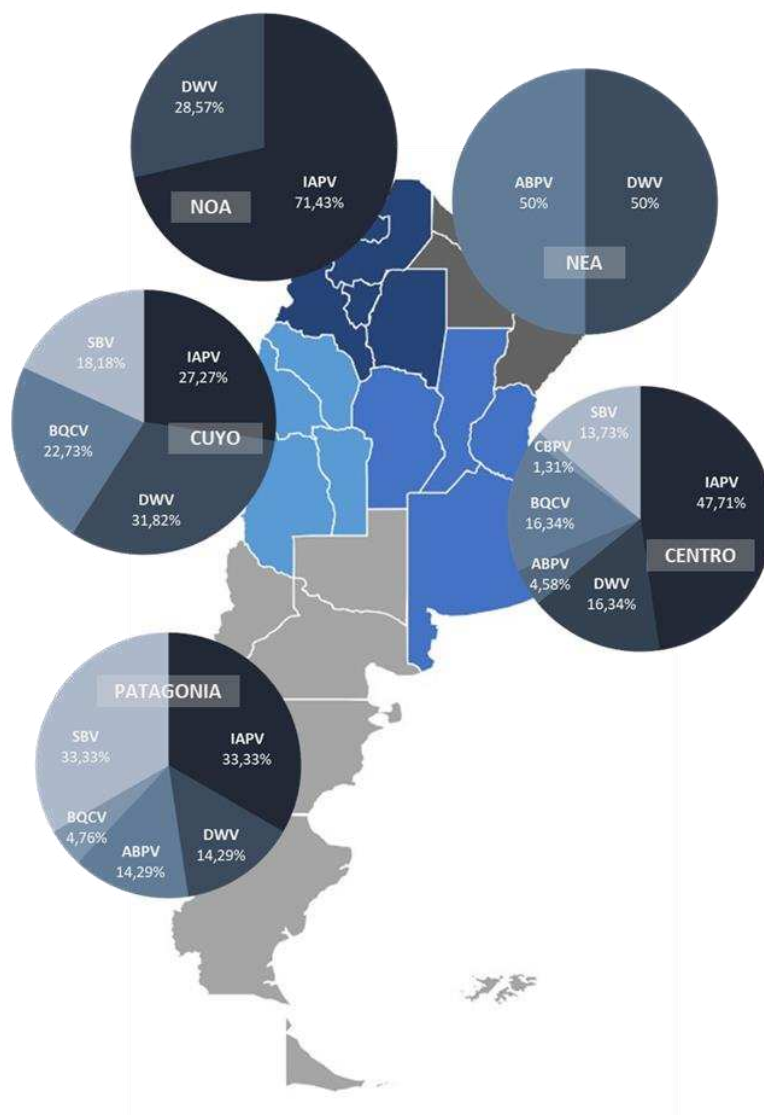
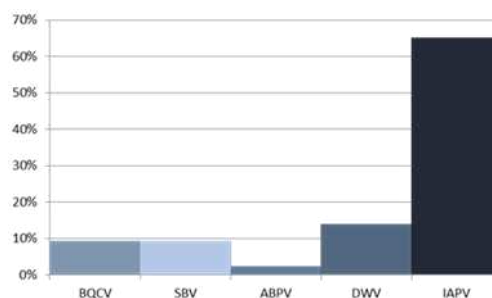


Figura 2.13 – Mapa de presencia y prevalencia de virus ARN por región productiva.

La prevalencia de las infecciones simples presentes para las poblaciones del país se encuentra graficada en la Figura 2.14. Por su parte, las co-infecciones de 2, 3 y 4 virus halladas suman un 36,76% de las muestras testeadas positivas y están detalladas en la Figura 2.15, siendo las más prevalentes: a) IAPV-DWV, presente en las regiones CENTRO y NOA; b) IAPV-SBV, en las regiones CENTRO y PATAGONIA; c) IAPV-BQCV, en CENTRO y CUYO; d) DWV-SBV, en CENTRO, CUYO y PATAGONIA; y e) IAPV-DWV-BQCV, en las regiones CENTRO y CUYO (Figura 2.15; Tabla 2.8).

Figura 2.14– Gráfico de barras para prevalencia de infecciones simples en el país.



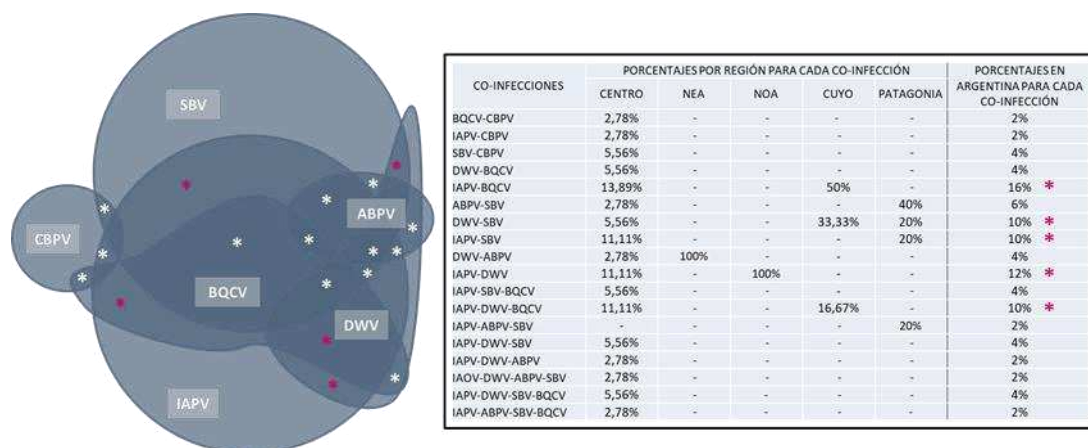


Figura 2.15 y Tabla 2.8 – Esquema de co-infecciones y cálculo de la proporción de cada una de ellas en el país y por región productiva. Los asteriscos marcan cada una de las co-infecciones, resaltado en color magenta las de mayor prevalencia.

3.3. Detección y cuantificación de niveles de infección por *Vairimorpha* spp.

La detección y estimación de la abundancia media de *Vairimorpha* spp. en las 361 colonias analizadas fue realizada a partir de la evaluación microscópica de las esporas del microsporidio (Figura 2.16).

Región	Provincia	N° muestras	<i>Vairimorpha</i> sp.	DESPRECIABLE	MUY LEVE	LEVE	MEDIO	GRAVE	MUY GRAVE
CENTRO	Buenos Aires	Cuenca del Salado	105	80	36	22	15	2	4
		Noroeste	38	37	28	9	-	-	-
		Delta	8	8	3	-	4	-	1
		Metropolitana	10	10	-	9	1	-	-
		Norte	11	11	-	-	2	1	8
		Sudoeste	33	33	14	14	3	-	2
	Entre Ríos	39	37	14	7	5	1	2	8
	Santa Fe	24	22	13	4	3	-	-	2
	Córdoba	41	41	7	4	7	3	-	20
	Misiones	15	11	2	6	3	-	-	-
NEA	Jujuy	4	4	1	2	1	-	-	-
NOA	Tucumán	5	5	-	-	-	1	-	4
	Catamarca	2	1	-	-	1	-	-	-
CUYO	San Luis	10	6	3	-	-	2	-	1
	Mendoza	19	19	12	4	2	-	-	1
PATAGONIA	La Pampa	18	16	5	3	-	-	-	7
	Río Negro	20	20	12	8	-	-	-	-
TOTAL		402	361	150	92	47	10	3	58

Tabla 2.9 – Niveles de infección por *Vairimorpha* spp. en las muestras analizadas discriminados por región y por provincia de acuerdo a la clasificación de Cornejo y Rossi (1975).

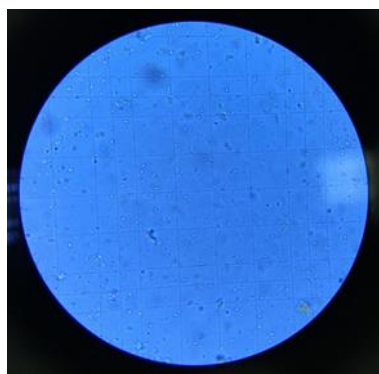


Figura 2.15 – Esporas de *Vairimorpha* spp. en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico de campo claro x400 con filtro de luz azul.

Las estimaciones fueron incluidas en la escala de valoración propuesta por Cornejo y Rossi (1975 – Tabla 2.9) con mayor prevalencia de los niveles DESPRECIABLE, MUY LEVE y MUY GRAVE en el análisis general para Argentina, pero con variaciones particulares por región (Figura 2.17).

La cuantificación de esporas/ml permitió evaluar los niveles de infección presentes en cada región productiva, siendo NEA la que presenta los niveles más bajos de infección (con un máximo de 285.000 esporas/ml). Las regiones restantes contienen valores de infección pertenecientes a la categoría con mayor gravedad (MUY GRAVE); con valores de hasta 2.290.000 esporas/ml (NOA), 17.400.000 esporas/ml (CUYO), 18.260.000 esporas/ml (CENTRO) y 16.040.000 esporas/ml (PATAGONIA); siendo NOA la que mayor prevalencia del nivel presenta (Figura 2.17).

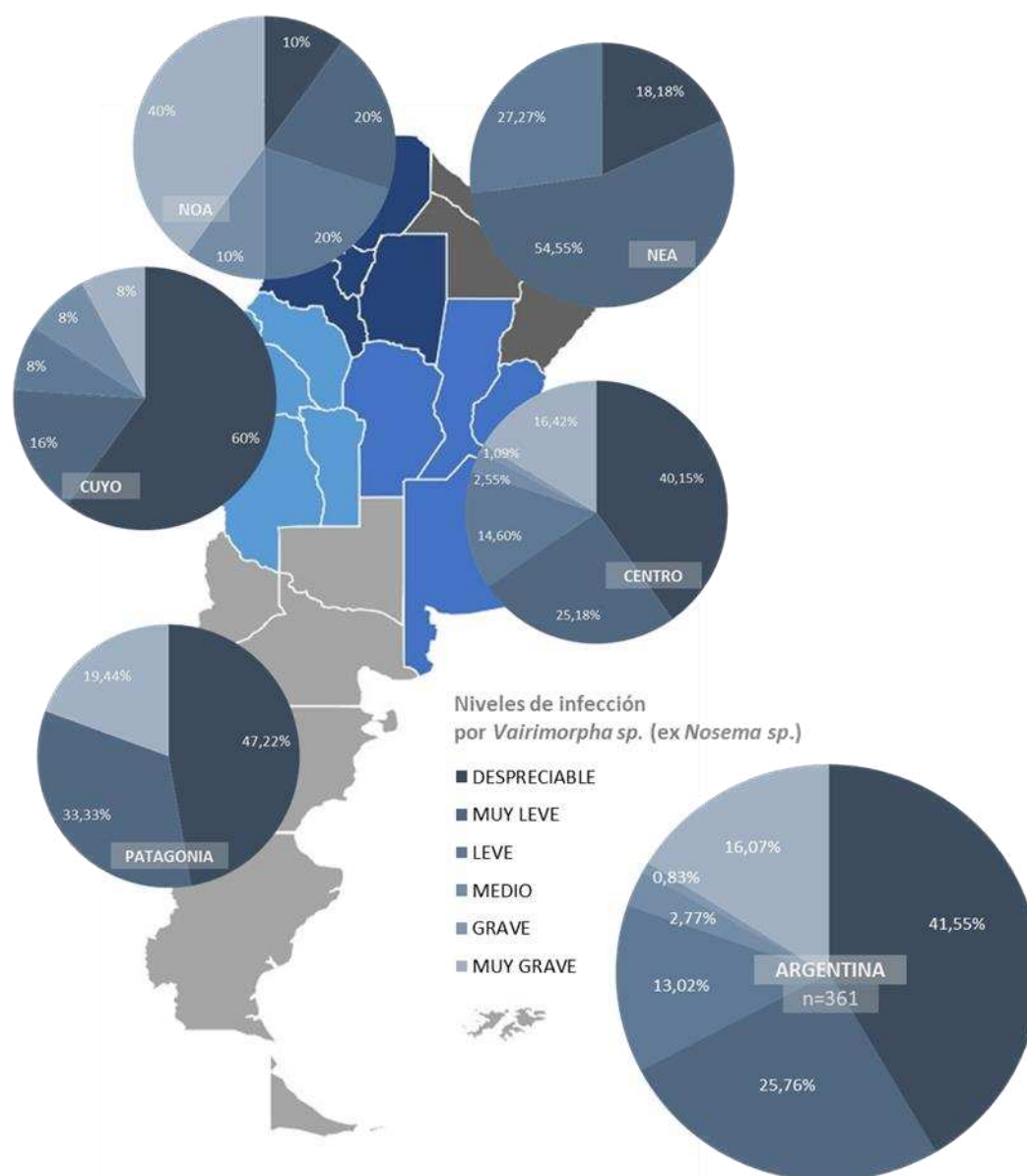


Figura 2.17 – Mapa de prevalencia de los niveles de infección por *Vairimorpha* spp. discriminado por regiones productivas y gráfico de prevalencia en el país.

3.4. Detección de bacterias y hongos

Del total de colonias analizadas para presencia de *A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius*, sólo una muestra perteneciente a Cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires (región CENTRO) resultó positiva para el agente

etiológico de cría yesificada y ninguna de las muestras analizadas presentó loque americana. Sin embargo, la detección de *M. plutonius* fue mayor (Tabla 2.10), resultando positivas el 17,92% de las poblaciones analizadas.

Región	Provincia		N° muestras	<i>Paenibacillus larvae</i>	Detección positiva	<i>Melissococcus plutonius</i>	Detección positiva	<i>Ascosphaera apis</i>	Detección positiva
CENTRO	Buenos Aires	Cuenca del Salado	105	92	-	92	8	92	1
		Noroeste	38	38	-	38	1	38	-
		Delta	8	8	-	8	4	8	-
		Metropolitana	10	10	-	10	7	10	-
		Norte	11	11	-	11	2	11	-
	Sudoeste	33	33	-	33	14	33	-	
	Entre Ríos	39	39	-	39	5	39	-	
	Santa Fe	24	23	-	23	5	23	-	
	Córdoba	41	41	-	41	12	41	-	
NEA	Misiones	15	15	-	15	-	15	-	
NOA	Jujuy	4	4	-	4	-	4	-	
	Tucumán	5	5	-	5	3	5	-	
	Catamarca	2	2	-	2	-	2	-	
CUYO	San Luis	10	7	-	7	1	7	-	
	Mendoza	19	19	-	19	3	19	-	
PATAGONIA	La Pampa	18	18	-	18	4	18	-	
	Río Negro	20	20	-	20	-	20	-	
TOTAL			402	385	-	385	69	385	1

Tabla 2.10 – Resultados de la detección de *A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius* en las muestras analizadas discriminados por región y por provincia.

A excepción de la región NEA, para la que no hubo detecciones positivas, loque europea fue registrada en las restantes regiones productivas del país.

Los valores de prevalencia fueron similares en todas las zonas, aunque los registros de presencia son mayores en el norte del país (NOA) y disminuyen conforme aumenta la latitud (Figura 2.18).

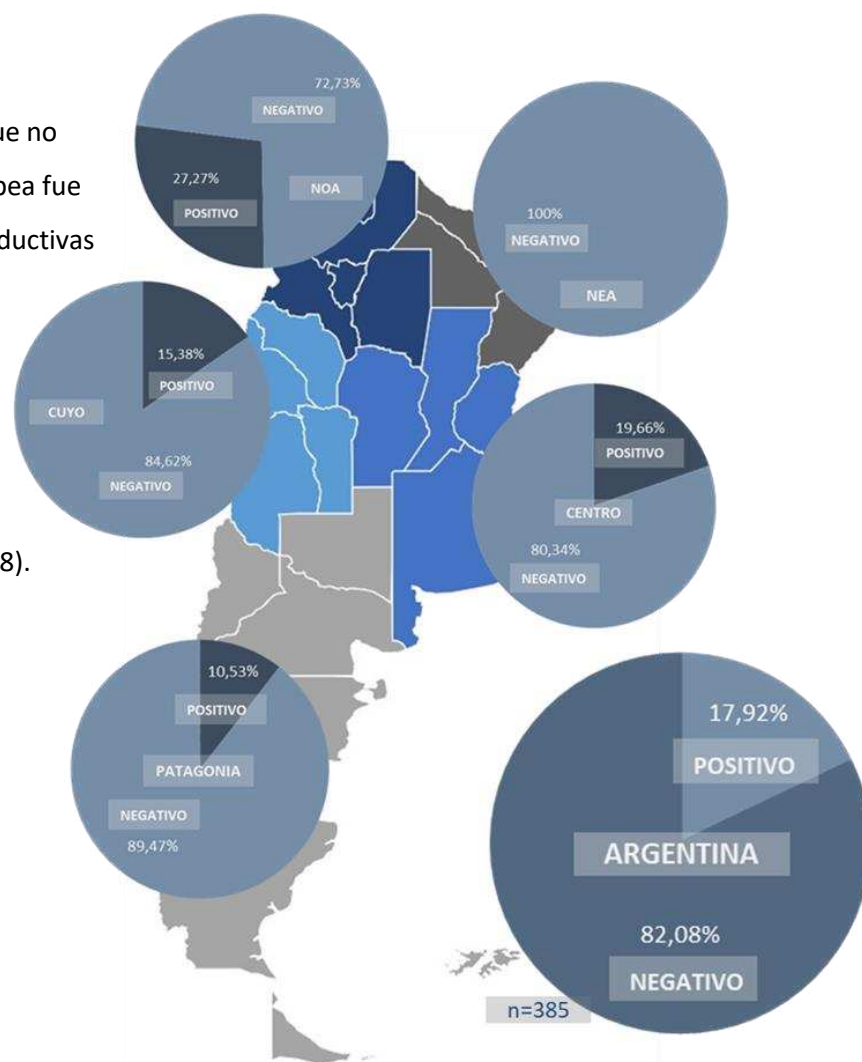


Figura 2.18 – Mapa de detecciones positivas y negativas de *M. plutonius* discriminado por regiones productivas y gráfico de prevalencia de loque europea en el país.

4. DISCUSIÓN

En este capítulo se presenta la situación actual de las enfermedades más prevalentes por zonas productivas a través de la descripción del perfil sanitario de las poblaciones de *A. mellifera* en torno a características biogeográficas, permitiendo actualizar la presencia y prevalencia de los patógenos asociados al despoblamiento de colonias que se encuentran en el país. El 71,68% de las muestras analizadas presentó detección positiva para uno o más de los patógenos analizados en este capítulo. De acuerdo con Chen *et al.* (2007), aunque las barreras físicas y químicas generalmente evitan que los patógenos ingresen al cuerpo de la abeja, éstos ocasionalmente las atraviesan y comienzan a multiplicarse. Así, la prevalencia individual para *Vairimorpha* spp. fue del 68,98% (tomando en cuenta todos los niveles de infección sin sumar los valores de cuantificación nulos de la categoría DESPRECIABLE). Mientras tanto, las prevalencias individuales del resto de las enfermedades no superaron el 50%. La prevalencia para *V. destructor* fue del 40,93%, los virus se hallaron representados en un 38,31% de las muestras, mientras que 17,92% fue el porcentaje representativo de *M. plutonius* y 0,26% la prevalencia para *A. apis*. Estos resultados se encuentran en relación con aquellos propuestos por otros autores para diferentes regiones del mundo (McMahon *et al.*, 2015; Natsopoulou *et al.*, 2015; Dolezal *et al.*, 2016; Tehel *et al.*, 2016; Khezri *et al.*, 2018; Mayack *et al.*, 2022). Si bien la presencia de un agente etiológico no implica enfermedad, indica un estado de latencia en la colonia y, cuando las condiciones se vuelven desfavorables generando *stress* e inmunodepresión, puede afectarla. Por otra parte, es importante destacar que al analizar las interacciones se debe contemplar el contexto del ambiente en el que se insertan, ya que la abeja se enfrenta a diversos estresores en las diferentes zonas que, a su vez, se encuentran bajo diferentes prácticas de uso de suelo (Fuentes *et al.*, 2022) y manejos apícolas.

4.1. Infestación por *Varroa*

Luego de su introducción en nuevas poblaciones de abejas, las habilidades reproductivas de *V. destructor* y, por lo tanto, el grado de infestación, eran bajos (Freeland *et al.*, 2011). Sin embargo, un incremento de la virulencia fue observado (Beaurepaire *et al.*, 2015) propiciando su mayor dispersión y su estrecha relación con las pérdidas de colonias en Latinoamérica (Maggi *et al.*, 2013, 2016; Antúnez *et al.*, 2015). Los resultados de este capítulo, arrojan una prevalencia en el país de 40,93%, presentando detección del ácaro en fase forética con valores de infestación entre 0,22% y 73,39% en 3 de las 5 regiones productivas analizadas. Reportes previos en Chile, Uruguay y Argentina indicaron una prevalencia de más del 70% (Maggi *et al.*, 2016). Esta mencionada disminución podría ser el resultado de varios factores, tales como la eficiencia del manejo integrado, que se realiza para disminuir el porcentaje de infestación en las colonias productivas y retrasar el umbral de tratamiento; la relación con los diversos haplogrupos y ecotipos de *A. mellifera*, que pueden influir en la capacidad reproductiva del ácaro; el proceso de coevolución huésped-parásito; la tolerancia que algunas

colonias desarrollan frente a las infestaciones y la relación con características ambientales en las diferentes zonas.

De acuerdo con estos valores de prevalencia, más de la mitad de las poblaciones analizadas se encuentran en la categoría 0%, y la mayor parte de las colonias que presentan infestación lo hacen con valores debajo del 4%. Estos niveles no representan una amenaza para la dinámica de las colonias, y podrían indicar que existen linajes, o incluso ecotipos, presentes en el país que exhiben buena capacidad de limpieza y gran comportamiento higiénico o algún nivel de tolerancia a la infestación. Frente a la presencia de patógenos o parásitos, los hospedadores pueden controlar su impacto mediante tolerancia o resistencia a los mismos (Clarke, 1986), definiendo tolerancia como la capacidad del hospedador para reducir el efecto del parásito; y resistencia como la capacidad del hospedador para reducir la reproducción del parásito (Schmid-Hempel, 2011). Por otra parte, actualmente existe una tendencia al control de *V. destructor* basado en la reducción del impacto de los ácaros, sin necesidad de su eliminación y sin daño a las abejas, a través de diferentes estrategias de manejo integrado, con un enfoque holístico centrado en la biología del ácaro y la relación hospedador-parásito (Vilarem *et al.*, 2021) sin implicar la aplicación de productos químicos, teniendo en cuenta su costo; el insumo de tiempo; el riesgo de generación de resistencia en los ácaros, disminuyendo su eficacia; los daños en las abejas y la acumulación de residuos en los productos de la colmena con su consecuente efecto (Rosenkranz *et al.*, 2010; Dietemann *et al.*, 2012). Adicionalmente, los tratamientos generalmente utilizados para el control del ácaro también remueven las presiones selectivas de la infestación natural, eludiendo procesos coevolutivos que lleven a una relación hospedador-parásito estable (Neumann & Blacquière, 2016) a partir de la inducción de presiones de selección recíprocas que generen rasgos de resistencia en el huésped y contraadaptaciones en el parásito (Van Valen, 1973; Milani, 1999; Schmid-Hempel, 2011), dirigiendo potenciales eventos de adaptación local (Delfinado-Baker, 1988; Calis *et al.*, 1999; Rosenkranz, 1999). Paralelamente, los ácaros de las colonias tratadas periódicamente pueden desarrollar adaptaciones a los acaricidas utilizados (Milani, 1999; Maggi *et al.*, 2009, 2010; González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016, 2018;), pudiendo inducir niveles significativos de diferenciación genética bajo diversos regímenes de manejo de plagas (de Meeûs *et al.*, 2007; Gandon *et al.*, 2008; Mazé-Guilmo *et al.*, 2016). Además, existe evidencia de variaciones significativas a nivel poblacional y de colonia (Beaurepaire *et al.*, 2015; Dynes *et al.*, 2017), en respuesta a la variación temporal de la cría de *A. mellifera* (Beaurepaire *et al.*, 2017), aunque *V. destructor* tenga un bajo nivel de diversidad genética fuera de su rango de distribución natural (Solignac *et al.*, 2005), y su dispersión a través del transporte de colonias por parte de los apicultores, pueda alterar los escenarios de adaptación local, dando lugar a poblaciones de ácaros homogéneas (Criscione *et al.*, 2005; Boulinier *et al.*, 2016). Así, la posible generación de resistencia frente a los acaricidas propiciada por la periodicidad o el incorrecto uso de los productos, y la elusión de los procesos coevolutivos asociados a las técnicas de control del ácaro y manejo de las colmenas, podría explicar la presencia de colonias con niveles de infestación mayores, considerados como una amenaza para su supervivencia y la producción. Del mismo

modo, el desarrollo de tolerancia y/o resistencia de las abejas frente a *Varroa*, puede limitar el daño causado por una carga parasitaria determinada, o bien atacar a los parásitos y reducir su carga (Raberg, 2009). Existe un problema potencial asociado a las abejas tolerantes y es la posibilidad de soportar una mayor carga de parásitos, actuando como un reservorio para las colonias susceptibles en los alrededores (Mitton *et al.*, 2022). Particularmente, el 7,25% de las muestras analizadas mostró porcentajes de infestación mayores a 4%. De la Sota & Bacci (2005) y Fries *et al.* (2003) mencionan que la colmena que ingresa a la invernada con valores superiores al 5%, presenta mayor probabilidad de muerte o fuga durante el invierno. Sin embargo, algunas poblaciones de *A. mellifera* exhiben rasgos de resistencia o tolerancia que le permiten coexistir con el ácaro durante períodos prolongados, sin requerir ningún tratamiento (Locke & Fries, 2011; Strauss *et al.*, 2016), contribuyendo a reducir la prevalencia de enfermedades infecciosas vectorizadas o facilitadas por la presencia de *V. destructor*, y mantener bajos índices de infestación. Una serie de comportamientos tales como el acicalamiento o *grooming* -*autogrooming* y *allogrooming*- y el comportamiento higiénico (Bak & Wilde, 2015; Locke, 2016; Leclercq *et al.*, 2017; Nganso *et al.*, 2017; Pusceddu *et al.*, 2021), han sido observados en colonias naturalmente resistentes, conduciendo a la reducción del éxito reproductivo de los ácaros (Oddie *et al.*, 2017; Nganso *et al.*, 2018). Fries *et al.* (2006a) demostraron que colonias infestadas por *V. destructor* pueden sobrevivir más de 6 años sin control, sugiriendo una relación hospedador-parásito que asegura la supervivencia de ambas partes, a partir de una serie de adaptaciones y contraadaptaciones (Tompson, 1994; Hafner *et al.*, 1994; Schmid-Hempel, 2011). La expresión de rasgos de resistencia en colonias infestadas mantenidas bajo presión de selección natural podría desempeñar un papel importante, por cuanto pueden afectar significativamente la aptitud del parásito (Neumann & Blacquière, 2016; Eliash & Mikheyev, 2020), resultando, a partir del proceso de selección, colonias con tasas de infestación más bajas y una mayor supervivencia en invierno (de la Mora *et al.*, 2020). Se han analizado estas poblaciones, poniendo de manifiesto que una amplia gama de mecanismos individuales y a nivel de colonia están involucrados, siendo muchos de ellos, heredables (Rinderer *et al.*, 2010; Kurze *et al.*, 2016b). Estos rasgos, han sido estudiados en Latinoamérica y, particularmente en Argentina, se observó mayor evidencia de *grooming* y supervivencia después de la invernada (Russo *et al.*, 2020b; Peck, 2021).

En cuanto a la regionalización de los porcentajes de infestación, en NEA y PATAGONIA no ha sido detectada la presencia del ácaro. Sin embargo, Mazepa *et al.* (2022) reportaron que las colmenas analizadas en la región NEA mostraron diferentes comportamientos respecto de los porcentajes de infestación del ácaro, presentando valores muy cambiantes entre colmenas, con máximos de 6,7% de infestación, mientras que otras colonias presentaron porcentajes bajos, incluso nulos. Adicionalmente, en contraposición a los resultados hallados para PATAGONIA, y en relación estrecha con las variaciones de las regiones CENTRO Y CUYO, Fuentes *et al.* (2022) advierten que las mayores pérdidas de colonias por varroasis se dan en climas fríos y templados. CENTRO, CUYO Y NOA exhibieron presencia del ácaro, presentando las categorías de infestación más altas, con los mayores porcentajes concentrados en CENTRO Y CUYO. Por su parte, Frey & Rosenkranz advirtieron en 2014,

que el crecimiento de la población a finales de temporada debe considerarse más cuidadosamente en regiones templadas, en dónde las colonias sufren mayores infestaciones y pierden mayor cantidad de abejas.

Conforme a lo esperado, a medida que aumenta el porcentaje de infestación, menor es la representación de cada categoría; sin embargo, las cuantificaciones de 5-10% en las regiones CENTRO y CUYO y >20% en la región CENTRO manifestaron una mayor proporción respecto de la esperada. Los valores máximos de cuantificación para CUYO y NOA fueron de 6,81% y 3,18%, respectivamente, la región CENTRO presentó valores de infestación mayores al 10%, particularmente en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, alcanzando cuantificaciones de 31,6%, 33% y hasta 73,39%. Aunque no existe un límite fijo para el número de ácaros que pueden ser tolerados y/o que correlacionan con el daño de las colonias, el rango entre 2000 y 4000 ácaros por colmena ha demostrado correlacionar con su colapso (Delaplane & Hood, 1999; Lanutti *et al.*, 2022) ya que, a nivel poblacional, las colonias altamente infestadas pueden verse reducidas en su capacidad reproductiva por la disminución significativa de las chances de apareamiento de los zánganos que fueron parasitados durante su desarrollo (Villa *et al.*, 2009). Del mismo modo, ha sido reportado que niveles de infestación mayores a 30% no permiten a las colonias sobrevivir el invierno (Fries *et al.*, 2003, 2006a; Rosenkranz *et al.*, 2010; Dieteman *et al.*, 2013) y se relacionan con el colapso de la colmena o abandono del nido.

Los problemas que enfrenta la industria apícola respecto de las infestaciones de ácaros probablemente estén relacionados con el propio sistema, en donde los apicultores eliminan la presión selectiva inducida por el parasitismo al eliminar los ácaros (Fries *et al.*, 2006a). Rosenkranz *et al.* (2010) propusieron la necesidad de métodos de control y tratamiento alternativos a los químicos que se realicen de forma sostenible, ligados al conocimiento de la biología del ácaro y de los mecanismos innatos de defensa que les permiten a las abejas tolerar la presencia del parásito. De este modo, la identificación de poblaciones de abejas resistentes proporciona información valiosa para una solución sostenible. Actualmente, los mecanismos más útiles para los programas de selección y mejoramiento son el comportamiento higiénico, la baja atraktividad de la cría, la supresión de la reproducción del ácaro, entre otros de difícil evaluación e incierta heredabilidad (Verde *et al.*, 2013). La velocidad con la que una colonia elimina la cría muerta, infectada o parasitada, se correlaciona con su capacidad de eliminar el brote enfermo (Akinwande *et al.*, 2014) y, aunque la remoción de la cría infestada no incluye necesariamente la muerte del ácaro, escapando en su mayoría, durante el proceso de remoción (Vaziritabar *et al.*, 2016), resulta en la interrupción del ciclo reproductivo, retrasando el crecimiento de la población del parásito en la colonia. La supresión del éxito reproductivo es considerada crucial en la resistencia adaptativa de *A. mellifera* (Mondragón *et al.*, 2006), traduciéndose en baja fertilidad, fecundidad y éxito de los ácaros, explicando la resistencia de las abejas en diversas poblaciones. Así, algunos apicultores utilizan la selección, especialmente por comportamiento higiénico, sin recurrir al tratamiento químico, manteniendo colonias altamente productivas sin ningún tipo de control (Message *et al.*, 2012).

Es importante considerar que el crecimiento de la población de *V. destructor* en las colonias es un rasgo seleccionable y hereditario (Lodesani *et al.*, 2002; Maucourt *et al.*, 2020), con influencia de muchas variables

que incluyen factores como las condiciones ambientales (clima y nutrición); la genética, tanto de los ácaros como de las abejas hospedadoras; la presencia de reinas viejas y las prácticas apícolas (Le Conte *et al.*, 1990; Guzman-Novoa *et al.*, 1996, 2012; de Guzman *et al.*, 1999; Harbo & Harris, 1999; Harris *et al.*, 2003; Giacobino *et al.*, 2014; Medina-Flores *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2020b), que del mismo modo, pueden tener un rol activo en la contribución de la supervivencia a las infestaciones (Mondet *et al.*, 2020). Además, las tasas de infestación y crecimiento de la población del ácaro se ven afectadas por la reinfestación debido a la deriva de abejas *-drifting bees-* (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2016; Nolan & Delaplane, 2017), mientras que su éxito reproductivo está influenciado por el tiempo de desarrollo de la cría y el comportamiento higiénico del hospedador, sumado a la capacidad reproductiva y el genotipo de los ácaros (de Guzmán *et al.*, 2007).

Aunque las nuevas técnicas de ARN de interferencia que inhiben la reproducción de *V. destructor* pueden ser útiles en el futuro (Leonard *et al.*, 2020), se necesita información adicional sobre la relación hospedador-parásito (Vilarem *et al.*, 2021), la biología básica, la arquitectura genética y la historia demográfica para desarrollar medidas de control y programas de reproducción sostenibles (Traynor *et al.*, 2020), comprendiendo las presiones selectivas que afectan el surgimiento de adaptaciones de diferentes poblaciones de abejas melíferas a *V. destructor*, que permitan mitigar su impacto (Beaurepaire *et al.*, 2022).

4.2. Presencia de virus ARN de cadena positiva

En cuanto a la detección de virus para Argentina, la prevalencia general es de 38,31% y se encuentran distribuidos en todas las regiones productivas, sin excepción. Sin embargo, las colonias muestreadas no presentaron sintomatología característica de ninguna de las virosis halladas, pudiendo indicar que los títulos de infección no fueron lo suficientemente altos como para propiciar el desarrollo de la enfermedad. La causa subyacente radica en que estos virus persisten naturalmente como infecciones incidentales de bajo nivel, o encubiertas, causando enfermedades manifiestas sólo ocasionalmente, con eventual amenaza a la supervivencia de la colonia (Martin *et al.*, 2010), si bien no es frecuente su muerte por consecuencia directa de infecciones virales, pero muchas de ellas se ven debilitadas (Dalmon *et al.*, 2021).

Si bien los virus ARN se encuentran ampliamente distribuidos en América del Sur (Antúnez *et al.* 2006, 2015; Lanzi *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2008, 2012; Reynaldi *et al.* 2010, 2011, 2013; Barriga *et al.* 2012; Freiberg *et al.* 2012; Rodríguez *et al.* 2012, 2014; Brasesco *et al.* 2013, 2020; Lucia *et al.* 2014; Yañez *et al.* 2014; Gamboa *et al.* 2015; Anido *et al.* 2015; Castilla *et al.* 2015; Ding *et al.*, 2016; Molineri *et al.*, 2017; Riveros *et al.*, 2017; Álvarez *et al.*, 2017; Genchi García *et al.*, 2019; Fernández de Landa *et al.*, 2020; Tibatá *et al.*, 2021; Salina *et al.*, 2021, 2023), y DWV, BQCV, SBV y ABPV son los que mayor dispersión presentan en el continente (Maggi *et al.*, 2016), es de gran complejidad la estimación de su prevalencia, debido a que la mayoría de los análisis se realizan a partir de casos de despoblamiento de colonias pudiendo sobreestimar su incidencia (Antúnez *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2008; Reynaldi *et al.* 2010; Rodríguez *et al.* 2012; Maggi *et al.*, 2016; Genchi García *et al.*, 2019). Así, se ha reportado presencia de DWV, BQCV, SBV y ABPV en Colombia (Tibatá *et al.*, 2021) y en

Ecuador (Bravi *et al.*, 2020); DWV, CBPV, SBV y BQCV en Uruguay (Antúnez *et al.*, 2005, 2006); DWV, ABPV, BQCV, IAPV, CBPV, KBV y SBV en Brasil (Chagas *et al.*, 2019; Guimarães-Cestaro *et al.*, 2024); DWV, ABPV, BQCV, IAPV, y SBV en Costa Rica (Chavez Galarza *et al.*, 2024) y BQCV, SBV, DWV y KBV en Chile (Rodríguez *et al.*, 2012; Riveros *et al.*, 2017); mientras que en Argentina se ha reportado mayoritariamente la presencia de ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV y SBV (Reynaldi *et al.*, 2010, 2011; Sguazza *et al.*, 2013; Brasesco *et al.*, 2013, 2020; Ding *et al.*, 2016; Molineri *et al.*, 2017; Genchi García *et al.*, 2019; Salina *et al.*, 2023).

DWV es considerado el virus más prevalente y virulento en el mundo (Mondet *et al.*, 2014; Natsopoulou *et al.*, 2017; Remnant *et al.*, 2017; Mayack *et al.*, 2022), aunque BQCV (Dalmon *et al.*, 2021), SBV (Remnant *et al.*, 2017) y el complejo AIK (Mayack *et al.*, 2022) también presentan elevada abundancia. Estos últimos, pueden presentar valores incluso mayores a los de DWV, teniendo en cuenta que IAPV se encuentra, junto con CBPV, dentro de los menos comunes entre poblaciones de abejas (Dalmon *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta análisis con muestreos aleatorios realizados en Argentina y Uruguay (revisado en Maggi *et al.*, 2016), las prevalencias de los virus se encuentran entre 2-87,4% para BQCV; 3-47% para DWV; 2-26% para SBV; 1-25% para CBPV; y 1-14,6% para ABPV (Anido *et al.*, 2015; Castilla *et al.*, 2015), sumado a los resultados de Reynaldi *et al.* (2011), quienes hallaron un 41% de detecciones positivas para IAPV en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, San Luis y Río Negro, aunque esta prospección fue realizada sobre colonias en colapso.

Particularmente en este estudio, las colonias analizadas no mostraban signos de colapso ni presentaban síntomas o signo alguno de enfermedad. El virus con mayor prevalencia fue IAPV, con un 44,39% de resultados positivos, encontrándose en relación con los resultados de prevalencia de Reynaldi *et al.* (2011), superando a DWV que fue el virus reportado con mayor prevalencia para Ding *et al.* (2016). Adicionalmente DWV, SBV y BQCV presentaron prevalencias similares entre sí, siendo 18,54%, 15,61% y 15,12% respectivamente, hallándose entre los valores estimados para la región. Del mismo modo, con valores de prevalencia asociados a los estimados anteriormente, aunque con la menor prevalencia en este análisis, se encuentran ABPV (5,36%) y CBPV (0,97%).

IAPV y KBV son virus comunes en Israel, Australia, Asia y Estados Unidos, aunque menos prevalentes en Europa y América del Sur (Tentcheva *et al.*, 2004; Cox-Foster *et al.*, 2007; Maori *et al.*, 2007; Antúnez *et al.*, 2009; de Miranda & Genersch, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Reynaldi *et al.* 2011; Teixeira *et al.* 2012; Porrini *et al.*, 2016; Riveros *et al.*, 2017; Tibatá *et al.*, 2021). Sin embargo y, aunque los resultados de este capítulo no reporten presencia de KBV en el país, IAPV ha sido el virus con mayor prevalencia, presente en 4 de las 5 regiones muestreadas, siendo el más prevalente en 3 de ellas. Adicionalmente, el tercer virus que conforma el complejo AIK, ABPV, se encuentra ampliamente distribuido y es hallado con alta frecuencia (Berényi *et al.*, 2006; Reynaldi *et al.*, 2010; Sguazza *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2016; Molineri *et al.*, 2017; Chagas *et al.*, 2019; Genchi García *et al.*, 2019; Bravi *et al.*, 2020; Tibatá *et al.*, 2021; Bordin *et al.*, 2022; Mayack *et al.*, 2022; Salina *et al.*, 2021; 2023), mientras que para los resultados expuestos, es uno de los virus con menor prevalencia en

Argentina, aunque presenta altos valores de detección en la región NEA. En relación con estos resultados, Mascena Peixoto *et al.* (2024), hallaron la presencia de cinco virus en Brasil, entre los que ABPV e IAPV fueron los de mayor prevalencia. Según lo reportado por Berényi *et al.* (2006), como ABPV, IAPV y KBV comparten una gran similitud genética, se supone la derivación de un ancestro común que luego evolucionó y se distribuyó independientemente en diversas áreas geográficas, pudiendo identificar mayor o menor prevalencia de alguno de ellos, en detrimento de los otros (Toplak *et al.*, 2012; Tlak Gajger *et al.*, 2021). Por otra parte, la dinámica de ABPV permite que este virus tenga un importante rol en el colapso de colonias, especialmente en invierno (Bordin *et al.*, 2022), pudiendo estar afectada su prevalencia por el momento de toma de muestra, generando un sesgo en el resultado. En contraste con el complejo AIK, los virus más prevalentes a nivel mundial son DWV y SBV (McMahon *et al.*, 2015; Remnant *et al.*, 2017; Manley *et al.*, 2019; Dalmon *et al.*, 2021). Chen & Siede (2007) registraron a SBV como el virus con mayor distribución, en relación con los reportes de Bailey *et al.* (1964) y Clark (1978). Morawetz *et al.*, (2018) lo reportaron como el de mayor prevalencia en Europa, tanto en colonias sintomáticas como asintomáticas (Blanchard *et al.*, 2014) y, aunque ha sido hallado en otras regiones del mundo en alta prevalencia (Beaurepaire *et al.*, 2020), los resultados de este capítulo lo posicionan en tercer lugar para el país. Pese a que su porcentaje de presencia se encuentra muy por debajo al de IAPV, se encuentra presente en 3 de las zonas muestreadas, ocupando junto con este el lugar de mayor prevalencia para PATAGONIA. Por su parte, DWV ha sido el segundo virus más prevalente, con presencia en las 5 regiones productivas registrándose como el de mayor incidencia en CUYO, y en NEA junto con ABPV, aunque su frecuencia es menor a la reportada en otros análisis realizados previamente para el país (Molineri *et al.*, 2017; Brasesco *et al.*, 2020; Salina *et al.*, 2023).

Si bien la prevalencia estimada para BQCV no lo ubica dentro de los virus con mayor presencia para las colonias de nuestro país, sí lo es para otras regiones del mundo (Bailey & Woods, 1977; Rodriguez *et al.*, 2012; Anido *et al.* 2015; Castilla *et al.* 2015; Chagas *et al.*, 2019; Beaurepaire *et al.*, 2020; Dalmon *et al.*, 2021; Tibatá *et al.*, 2021, Bordin *et al.*, 2022) con gran incidencia en las poblaciones de abejas adultas (Tentcheva *et al.*, 2004). Fue hallado en 3 de las regiones productivas analizadas, y se ha ubicado como segundo virus más prevalente en la región CUYO. Teniendo en cuenta que tanto DWV, BQCV como SBV presentan su mayor incidencia en primavera y verano (Tentcheva *et al.*, 2004; Bordin *et al.*, 2022), los análisis de prevalencia no deberían reflejar sesgos en los resultados debido a la época de muestreo.

Aunque CBPV se encuentra ampliamente distribuido (Tentcheva *et al.*, 2004; Antúnez *et al.*, 2005; Berényi *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2008; Sguazza *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2016; Dalmon *et al.*, 2021; Mráz *et al.*, 2021; Tlak Gajger *et al.*, 2021; Bordin *et al.*, 2022; Salina *et al.*, 2023), probablemente debido al intercambio comercial intensivo (Allen & Ball, 1996), los resultados para este capítulo lo reportan como el virus menos prevalente en el país, hallado sólo en una de las regiones analizadas y, particularmente solo en co-infecciones. Las diferencias puntualizadas con otros estudios sugieren la posibilidad de una particular distribución, presencia y prevalencia de los virus, en asociación con las características ambientales, específicamente de

floración y climáticas de nuestro país, y en relación con los diversos ecotipos desarrollados en cada región particular.

De acuerdo con las observaciones de Molineri *et al.* (2017), quienes reportaron que las infecciones virales son más frecuentes en zonas templadas, CENTRO fue la región que presentó mayor cantidad de virus, seguida en abundancia por la región PATAGONIA, CUYO, y luego NOA y NEA. En la región CENTRO se determinó la presencia de IAPV, DWV, BQCV, SBV, ABPV y CBPV, en relación a los análisis realizados para la misma zona por Sguazza *et al.* (2013) y Salina *et al.* (2023), mientras que Reynaldi *et al.* (2010) reportaron presencia de CBPV, ABPV y SBV. La región presentó mayor prevalencia de IAPV, seguido por DWV y BQCV (en igual proporción), mientras que NEA presentó solo presencia de DWV y ABPV con un 50% de detecciones positivas para cada uno de ellos. Molineri *et al.* (2017) realizaron un estudio que abarcó las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa (pertenecientes a las regiones CENTRO y NEA) hallando DWV y ABPV como los virus más prevalentes, aunque BQCV presentó valores menores e IAPV no fue detectado. CBPV fue detectado para la región CENTRO, pero su prevalencia es menor a la previamente reportada por Molineri *et al.* (2,2%) y por Reynaldi *et al.* (26,2%). Del mismo modo, la presencia de diferentes variantes de DWV fue reportada por Brasesco *et al.* (2020) para las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Santiago del Estero, Río Negro y Mendoza (pertenecientes a las regiones CENTRO, NOA, CUYO y PATAGONIA), mientras que los resultados de este capítulo determinan su presencia en las 5 regiones productivas, aunque con diferencia de prevalencia, siendo el virus más prevalente en CUYO.

El porcentaje de infecciones simples fue mayor al 50% en CENTRO, CUYO, NEA y PATAGONIA, a diferencia de NOA, donde la presencia de virus se manifestó únicamente en forma de co-infecciones. Las co-infecciones más prevalentes fueron a) IAPV-DWV (CENTRO y NOA); b) IAPV-SBV (CENTRO y PATAGONIA); c) IAPV-BQCV (CENTRO y CUYO); d) DWV-SBV (CENTRO, CUYO y PATAGONIA); y e) IAPV-DWV-BQCV (CENTRO y CUYO), y el total de ellas sumó un 36,76% de las muestras testeadas. Un factor importante en la presencia de co-infecciones es que la presencia de un virus puede facilitar la detección de otros (Mondet *et al.*, 2014) debido a su capacidad de transmisión (Zhao *et al.*, 2019; Dubois *et al.*, 2020) e inmunosupresión.

Cada región productiva presentó un perfil de infecciones virales diferente, sugiriendo una asociación con las características ambientales de cada zona, como las condiciones climáticas y la presencia o ausencia de otros patógenos. Castelli *et al.* (2021) proponen que la distribución geográfica propicia una dinámica espacio-temporal de las infecciones que es compleja. De acuerdo con ello, y respecto de los análisis previos presentados para el país, no solo la presencia, sino también las diferencias en las prevalencias, indicarían un cambio en el escenario predisponente para la aparición, expresión y transmisión de estos patógenos.

Algunos de estos virus han sido también asociados a los parásitos *V. destructor* y *Braula schmitzi*, y han sido registrados en otras poblaciones de artrópodos (Shen *et al.*, 2005a; Di Prisco *et al.*, 2011; Francis *et al.*, 2013; Reynaldi *et al.*, 2013; Lucía *et al.*, 2014; Mondet *et al.*, 2014; Alvarez *et al.*, 2017; Avalos *et al.* 2019; Posada-Florez *et al.*, 2019; Truitt *et al.*, 2019; Bravi *et al.*, 2019, 2020; Figueroa *et al.*, 2020; Piot *et al.*, 2020; Yañez *et*

al., 2020; Susevich *et al.*, 2021; Dalmon *et al.*, 2021; Rasmussen *et al.*, 2021), que podrían potencialmente participar como reservorios o en la transmisión de las infecciones virales (Levitt *et al.*, 2013; Dobelmann *et al.*, 2020; Yañez *et al.*, 2020). Además, poseen una gran capacidad de riesgo de *spillover* debido a su gran adaptabilidad y distribución, aumentando el riesgo de incrementar su rango de especies hospedadoras (Evison *et al.*, 2013) y su presencia en el ambiente. La dispersión puede verse favorecida por la limitación de la respuesta inmune que genera la infestación por *V. destructor*, así como las alteraciones en los patrones de señalización, que llevan al debilitamiento de la colonia y el aumento de las cargas virales por inmunosupresión como resultado de infecciones secundarias (Mondet *et al.*, 2014; Annoscia *et al.*, 2019). Adicionalmente, algunos autores sugieren que las flores presentan un papel importante en esta transmisión (Durrer & Schmid-Hempel, 1994; Singh *et al.*, 2010; Alger *et al.*, 2019; Yañez *et al.*, 2020; Burnham *et al.* 2021; Dalmon *et al.*, 2021).

Una de las alternativas propuestas para el control de los virus puede ser el control eficiente de *Varroa*, que reduce considerablemente el impacto de las co-infecciones (Rosenkranz *et al.*, 2010). Otros estudios sugieren que la resistencia a los virus tiene un importante componente genético (Dieteman *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2013), mientras que otros autores estudian la posibilidad de generación de ARNs de interferencia (Yang *et al.*, 2018). En este sentido, el conocimiento de la prevalencia de los virus en el ambiente, junto con sus rutas de transmisión, es una herramienta indispensable para el desarrollo de planes de contingencia para el control de pérdidas de abejas afectadas por virus en cada situación regional particular, como también para la generación de alternativas de manejo integrado que permitan reducir las cargas de patógenos en las colonias y mejorar su estado sanitario. Del mismo modo, diferencias ecológicas entre los hospedadores pueden estar relacionadas a la prevalencia de las infecciones, por ello es necesario realizar estudios periódicos y analizar su dinámica en relación con las comunidades de artrópodos que coexisten con ellos para determinar el rol de hospedador, reservorio o potencial vector en un marco ecosistémico más amplio al de la colonia de abejas.

En conclusión, la prevalencia de virus y su habilidad para producir la enfermedad, es el resultado de múltiples factores, por lo tanto, es preciso realizar análisis holísticos, con cierta periodicidad, que permitan no sólo evaluar la presencia de los patógenos sino también su interrelación y la implicancia en la supervivencia de las colonias, para poder prevenir posibles brotes por aumento de cargas virales.

4.3. Infección por *Vairimorpha* spp.

El microsporidio *Vairimorpha* spp. es uno de los parásitos de *A. mellifera* con mayor prevalencia a nivel mundial (Higes *et al.*, 2013b; Goblirsch *et al.*, 2018; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Blot *et al.*, 2023). Los resultados de este capítulo exhiben una incidencia en Argentina del 68,98%, prevalencias similares a las halladas por Pacini *et al.* (2021). Adicionalmente, este parásito ha sido registrada en otros países de la región y del mundo con elevada frecuencia en las poblaciones (Chauzat *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Traver & Fell, 2011a, 2011b; Kamler *et al.*, 2011; Botías *et al.*, 2012; Staroň *et al.*, 2012; Csáki *et al.*, 2015; Milbrath *et al.*,

2015; Porrini *et al.*, 2016; Papini *et al.*, 2017; Shumkova *et al.*, 2018; Matthijs *et al.*, 2020). La detección y estimación de la abundancia media del microsporidio presentó mayor prevalencia de los niveles DESPRECIABLE, MUY LEVE y MUY GRAVE en el análisis general, con variaciones particulares por región productiva. NEA presenta los niveles más bajos de infección (con un máximo de 285.000 esporas/ml), resultados similares a los hallados por Mazepa *et al.* (2022) para la zona. Las regiones restantes contienen valores de infección pertenecientes a la categoría con mayor gravedad (MUY GRAVE), siendo NOA la que mayor prevalencia del nivel presenta, seguida por CENTRO, CUYO y PATAGONIA. Molina *et al.* (1990), observaron un 55% de prevalencia en primavera, y valores similares fueron registrados por Espósito *et al.* (2007) en la provincia de Río Negro. Numerosos factores han sido reportados con influencia directa en la aparición, dinámica y virulencia de la enfermedad, como las condiciones ambientales, las prácticas apícolas, la genética de las abejas, y la interacción con agroquímicos y otros patógenos (Klee *et al.*, 2007; Fries, 2010; Gisder *et al.*, 2010; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Galajda *et al.*, 2021), que propician diferentes grados de incidencia según la región analizada.

Si bien es una enfermedad de amplia distribución, se la considera de importancia en regiones templadas en asociación a factores climáticos como la temperatura, humedad y precipitaciones (De la Sota & Bacci, 2005; Martín-Hernández *et al.*, 2009; Gisder *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). El potencial de exposición a esporas dentro de la colonia aumenta cuando el clima adverso impide el vuelo de limpieza de las abejas infectadas, y en consecuencia, la temperatura puede afectar la intensidad del parásito (Meixner *et al.*, 2014; Retschnig *et al.*, 2017), por lo que se espera encontrar recuentos de esporas más altos en las regiones templadas en comparación con ambientes más benignos como las regiones subtropicales. Sin embargo, Blot *et al.* (2023) proponen que el parásito podría beneficiarse de la reducción en la variación estacional que presentan los climas tropicales y subtropicales. Por otra parte, la infectividad de las distintas especies de *Vairimorpha* spp. varía con las condiciones climáticas propiciando dinámicas de infección que le permiten presentar un crecimiento poblacional diferencial en distintas estaciones y regiones, pudiendo hallar altas cargas del parásito incluso en invierno o en climas fríos (Fries, 2010; Gisder *et al.*, 2010, 2017; Chen *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013) con síntomas graves (Galajda *et al.*, 2021). Si bien el clima es un rasgo particularmente importante en el ciclo de vida de los microsporidios y la evolución del parasitismo (Fries, 2010; Meixner *et al.*, 2014), Pacini *et al.*, (2021) sugieren que las variaciones de temperatura y humedad, por sí solas, no explican los niveles de infección en las diferentes regiones de Argentina. Estas diferencias regionales pueden estar relacionadas a los recursos nutricionales con impacto directo en la salud de las abejas (Alaux *et al.*, 2010b; Branchiccela *et al.*, 2019). Así, una dieta polifloral con polen de buena calidad, afecta positivamente la fisiología de las abejas nodrizas, y la tolerancia a *Vairimorpha* sp. (Crailsheim & Stolberg, 1989; Huang, 2012; Di Pasquale *et al.*, 2013; Ferguson *et al.*, 2018; Castelli *et al.*, 2020). A su vez, el comportamiento higiénico también podría estar relacionado con las reservas de polen, en tanto Janmaat & Winston (2000) observaron que la tasa de remoción de larvas infectadas se incrementó con mayores reservas de polen, indicando su posible contribución al

control de la enfermedad. Al mismo tiempo, las prácticas apícolas pueden promover las formas más virulentas de patógenos mediante transmisión horizontal (Fries & Camazine, 2001).

Para Jabal-Uriel *et al.* (2022) tanto la edad de la abeja como la estación del año presentan un importante rol en la dinámica de la infección. Así, se han reportado patrones estacionales para las distintas especies de *Vairimorpha* spp., en diversas regiones del mundo (Molina *et al.*, 1990; Copley *et al.*, 2011; 2012; Mazepa *et al.*, 2022). Por otra parte, Mendoza *et al.*, (2013) y Fries *et al.* (2013) reportaron que la infección incide en el tamaño de las colonias y la mortandad durante el invierno. La infección producida por este parásito puede inducir cambios fisiológicos y de comportamiento, eventualmente reduciendo su supervivencia, con posibles interacciones nocivas con otros estresores (Higes *et al.*, 2013a; Goblirsch *et al.*, 2018; Martín-Hernández *et al.*, 2018; Blot *et al.*, 2023). Sumado a ello, el microsporidio fue detectado en colonias en colapso (Chen *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2008; Martín-Hernández *et al.*, 2018), aunque su rol en este fenómeno ha sido ampliamente debatido (Chen *et al.*, 2012; Schüller *et al.*, 2023). En Argentina se ha explorado su impacto y, mientras algunos autores concluyeron que la nosemosis produce una alta mortalidad de las colonias de *A. mellifera* (Sarlo, 2010), otros estudios no pudieron encontrar relación entre los recuentos de esporas y los parámetros de fuerza de la colonia o mortalidad relacionada con infecciones altas (Signorini *et al.*, 2014).

Existen numerosos factores que favorecen el riesgo de infección, aunque esta puede desaparecer por sí sola al comienzo de la temporada, cuando las abejas salen de la hibernación. Sin embargo, Higes *et al.* (2008) describieron a este fenómeno en primavera como una falsa recuperación, ya que cuando la colonia crece rápidamente, la reina aumenta su postura, y como resultado del aumento de la población, se evidencia una disminución de la prevalencia. Esto puede explicar la mayor prevalencia de los niveles de abundancia menores para las colonias analizadas.

Teniendo en cuenta que la prevalencia del parásito varía según las condiciones ambientales, y entre colonias (Varis *et al.*, 1992), tanto su detección como la prevención son importantes para las poblaciones de abejas y para la producción, ya que la lesión del aparato digestivo lleva al aumento del consumo de las reservas corporales y a la disminución del forrajeo, que se traduce en menor producción de miel y actividad de polinización (Anderson & Giacon, 1992; Higes *et al.*, 2008; Antúnez *et al.*, 2009). Adicionalmente, se desencadena un desequilibrio en la población que debilita a la colmena. Además, la tolerancia a otras enfermedades es menor cuando las colmenas están afectadas por nosemosis (Vivas Espinosa, 2015), pudiendo propiciar brotes de otras enfermedades (Martín-Hernández *et al.*, 2012).

Existen numerosas estrategias de control y prevención para contrarrestar el efecto del microsporidio. Las buenas prácticas apícolas y las medidas de bioseguridad brindan herramientas que permiten evitar su propagación (Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010; Muñoz *et al.*, 2014; Rivera-Gomis *et al.*, 2019; Pietropaoli *et al.*, 2021; Pietropaoli & Formato, 2021; Formato *et al.*, 2022); la selección de poblaciones resistentes tiene un gran potencial entre las soluciones sostenibles (Hatjina *et al.*, 2014); la utilización de extractos de plantas y compuestos orgánicos reportaron ser efectivos para el control de nosemosis (Tauber *et al.*, 2019; Iorizzo *et al.*,

2022); y la posibilidad de control a partir de la utilización de ARNi ha exhibido buenos resultados (Kim *et al.*, 2020). Aún así, la solución más eficaz y sostenible para la prevención y el control, radica en adoptar diferentes medidas y combinarlas en una estrategia de manejo integrado. Sin embargo, es necesario determinar los métodos a combinar, así como cuándo y cómo adoptarlos, para alcanzar la mayor eficacia posible en cada región productiva.

Finalmente, realizar detecciones periódicas e informar la presencia de *Vairimorpha* spp., es importante para prevenir el aumento de la carga de esporas y el consecuente desarrollo de la enfermedad.

4.4. Detección de bacterias y hongos

Del total de colonias analizadas sólo una muestra perteneciente a Cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires (región CENTRO) resultó positiva para *A. apis*. Si bien Kluser & Peduzzi (2007) reportaron el aumento de la incidencia de este patógeno y se ha registrado previamente en todas las zonas productivas de Argentina (Reynaldi *et al.*, 2003), una explicación plausible para su reducida prevalencia en este análisis puede encontrarse en su baja incidencia en el país. El último reporte realizado para Argentina, por Reynaldi *et al.* (2003) presentaba una incidencia del 13%, en contraposición a los reportes realizados para otros países en donde las prevalencias fueron diferentes –menos del 5% en España (Garrido-Bailón *et al.*, 2013), 24% en Japón (Yoshiyama & Kimura, 2011)–. Los valores menores de incidencia pueden explicarse a partir del uso generalizado de fungicidas en los ambientes agrícolas (Evans *et al.*, 2018), aunque existe un reporte que ha registrado un efecto aditivo en la mortalidad de las larvas como resultado de estos dos factores (presencia de *A. apis* y exposición a fungicidas) (Krichilsky *et al.*, 2021). Por otra parte, como las infecciones son frecuentes durante la primavera (Flores *et al.*, 1996; Borum & Ulgen, 2008), y las colonias se encuentran en crecimiento, es probable la erradicación temprana del brote de la enfermedad, a partir de la eliminación de la cría infectada en aquellas colmenas con buena capacidad de reconocimiento de larvas infectadas (Akinwande *et al.*, 2014), en condiciones ambientales favorables que permitan un crecimiento exponencial de la colonia. Si bien Albo *et al.* (2010) expresan que la resistencia natural al patógeno es baja y la diseminación de la enfermedad puede verse favorecida por la trashumancia, sumado a la inmunodepresión causada por diversos factores que puede facilitar el ingreso del patógeno, las estrategias de renovación de reinas con buenas características de limpieza y el recambio de cuadros son herramientas que contribuyen a mitigar el desarrollo de brotes de *A. apis* (Aronstein, 2010). Adicionalmente, este hongo requiere condiciones de alta humedad combinada con bajas temperaturas (Flores *et al.*, 1996; Borum & Ulgen, 2008), lo que dificulta su desarrollo en la zona norte del país en donde estas condiciones no son frecuentes. Sumado a ello, el aumento del calor en la colonia durante la primavera y el verano por las condiciones ambientales cada vez más extremas asociadas al calentamiento global, aún en zonas frías, contribuyen al descenso de la incidencia de este patógeno.

Si bien la enfermedad causada por *P. larvae* afecta a las crías (Forsgren *et al.*, 2013), y se vuelve letal en cuestión de pocos meses (Hansen & Brødsgaard, 1999; Genersch, 2010), las abejas obreras adultas infectadas

llevan la bacteria consigo pudiendo difundirla dentro de y entre las colonias. En el análisis realizado por Alippi *et al.* (2004) más de la mitad de las muestras resultó ser positiva para la bacteria, y según Marcangeli *et al.* (2005), la incidencia llegaba al 30% en algunas regiones. Sin embargo, ninguna de las muestras de abejas obreras analizadas en este capítulo presentó *P. larvae*. Adicionalmente, tanto Tibatá *et al.* (2018b) como Mayack *et al.* (2022), no detectaron AFB en sus análisis, mientras que Garrido Bailón *et al.* (2013) reportaron su presencia, aunque en baja frecuencia. Estos resultados, están en relación con los análisis periódicos realizados en la última década, que arrojaron baja prevalencia de la bacteria alrededor del mundo (Mayack *et al.*, 2022), indicando una exitosa aplicación de medidas de monitoreo, prevención y control, particularmente en nuestro país en dónde se redujo notablemente la prevalencia de la enfermedad.

Por otra parte, la infección por *M. plutonius* es considerada endémica y activa en Argentina, aunque sin datos de prevalencia (Maggi *et al.*, 2016). La presencia de la bacteria fue detectada en las colonias analizadas con una incidencia de 17,92%, aunque éstas no presentaran signología de EFB, tal como proponen Roetschi *et al.* (2008), Budge *et al.* (2010), Gaggia *et al.* (2015) y Erban *et al.* (2017). Estos resultados se encuentran en relación con la baja prevalencia hallada por Mayack *et al.* (2022), para colonias en condiciones sanitarias similares, y podrían deberse a los comportamientos higiénicos en abejas obreras que son inducidos por la presencia de EFB (Kathe *et al.*, 2021). Sin embargo, casi la totalidad de las muestras fueron positivas para *M. plutonius* en Estados Unidos (O'Grady Milbrath *et al.*, 2021), poniendo de manifiesto que la aparición de la infección depende de la relación con estresores como la disponibilidad de alimento y las condiciones climáticas de cada zona (Forsgren, 2010). Si bien EFB solo afecta de manera directa al intestino medio de las larvas (Forsgren, 2010), las bacterias se pueden encontrar en toda la colmena, pudiendo hallarse en pupas sobrevivientes a una infección que luego emergen como adultos portantes de la bacteria (Bailey & Ball, 1991; Forsgren *et al.*, 2005). A su vez, las abejas obreras adultas infectadas transportan al agente etiológico (Belloy *et al.*, 2007; Erban *et al.*, 2017), convirtiendo a los adultos de casi todas las colonias de los apiarios con casos clínicos de EFB, en portadores de la bacteria (Forsgren, 2010; Erban *et al.*, 2017).

La región NEA no presentó detecciones positivas, sin embargo, EFB fue registrada en las restantes regiones productivas con valores de prevalencia similares en todas las zonas. El mayor registro de presencia se observó en NOA, disminuyendo en las otras regiones conforme aumenta la latitud. EFB puede permanecer en estado enzoótico, hallándose presente sin signos de enfermedad en colonias aparentemente sanas (Pinnock & Featherstone, 1984; Belloy *et al.*, 2007; Budge *et al.*, 2010; De León Door *et al.*, 2018), y lejos de brotes actuales (Budge *et al.*, 2010; Erban *et al.*, 2017), y puede limitar su presencia a apiarios específicos (Garrido Bailón *et al.*, 2013).

Tanto *P. larvae* como *M. plutonius*, presentan distribución mundial y serias consecuencias con un gran impacto en la industria apícola, ya que pueden llevar a la colonia a su colapso si no se realiza tratamiento de la enfermedad (OIE, 2009; Alonso-Salces *et al.*, 2017; de León-Door *et al.*, 2020; Devi *et al.*, 2021). Por este motivo, se recomiendan análisis de detección periódicos (de la Sota & Bacci, 2005; OIE, 2023a, 2023b). En

Argentina, los brotes de las loques no se tratan con medicamentos químicos, sino que para EFB se aplican medidas de manejo que permitan eliminar o disminuir la carga de patógenos, como cuidados de limpieza e higiene del material, la disminución o eliminación del trasiego, el recambio de reinas en los casos en los que la colonia haya perdido vigor y, en los casos de presencia de AFB, la quema y eliminación de todo el material de colmena infectada (De la Sota & Bacci, 2005; OIE, 2023a, 2023b). Así, es importante realizar estos análisis en abejas adultas, debido a que son las responsables del contagio entre las crías de una misma colonia, quienes pueden también transmitirlo a colonias cercanas, contaminar los recursos alimenticios de los que otras abejas y polinizadores se abastecen, y principalmente, permiten detectar la presencia de las bacterias aún cuando no hay signos clínicos en la cría, pudiendo prever y controlar posibles brotes de las enfermedades, sin necesidad de realizar mayores disturbios en la colonia. Por otra parte, la realización de estos análisis en abejas adultas es una excelente herramienta de diagnóstico de la salud de la colonia.

Es importante tener en cuenta algunas consideraciones para el tratamiento y análisis de patógenos, y sus consecuentes conclusiones, para poder ser aplicados en planes de manejo que impliquen una mejora tanto para la colonia como para la producción. Normalmente, las colonias se mantienen en áreas cercanas a muchas otras, lo que aumenta la posibilidad de transmisión de patógenos a través de la deriva de obreras, el manejo o el pillaje y, adicionalmente, están sujetas a cambios, en ocasiones drásticos, en la disponibilidad de alimentos cuando se transportan largas distancias por trashumancia o para polinización de cultivos (Milbrath, 2021). Particularmente en las actividades migratorias, el riesgo de transmisión de enfermedades es casi constante. Por otra parte, la reanudación de la actividad en primavera es un momento importante para el desarrollo de la colonia influido tanto por las intervenciones realizadas por los apicultores en otoño e invierno, como por la aparición o emergencia de patógenos (Bordin *et al.*, 2022). Esto suele conducir a generar infecciones encubiertas, como también brotes sintomáticos de las enfermedades. Así, cuando la proliferación del patógeno es limitada, reduce la probabilidad de transmisión horizontal, sin embargo, la supervivencia a largo plazo del huésped infectado aumenta la posibilidad de transmisión vertical (Chen *et al.* 2006b). Del mismo modo la velocidad con la que una colonia elimina el brote de una enfermedad se correlaciona generalmente con su capacidad de limpieza (Akinwande *et al.*, 2014). Actualmente existen trabajos en desarrollo que proponen la identificación de las características etológicas y genéticas que confieren resistencia a las colonias (Locke, 2016; Strauss *et al.*, 2016; Leclercq *et al.*, 2017; Nganso *et al.*, 2017, 2018; Eliash & Mikheyev, 2020; de la Mora *et al.*, 2020; Maucourt *et al.*, 2020; Russo *et al.*, 2020b; Mondet *et al.*, 2020; Pusceddu *et al.*, 2021; Castelli *et al.*, 2021), para ser utilizados en programas de mejoramiento, y para ser empleados en el desarrollo de nuevas estrategias de bloqueo. Por tanto, el desarrollo de estudios que determinen la presencia de diferentes patógenos en las colonias puede ayudar a establecer la relación entre ellos para correlacionarlos con el desarrollo de enfermedades, y así proporcionar datos para el establecimiento de políticas sanitarias a nivel nacional.

CAPÍTULO 3

Interacción entre las principales enfermedades presentes y los linajes maternos hallados en las poblaciones de *A. mellifera* L. de Argentina.

1. INTRODUCCIÓN

La salud de las abejas es un problema importante para la sostenibilidad de la apicultura y la polinización (Klein *et al.*, 2007; Kulhanek *et al.*, 2017; Gray *et al.*, 2020) y la tendencia actual de disminuciones drásticas en la población mundial se ha relacionado a las interacciones complejas entre patógenos, parásitos, agroquímicos, mala nutrición y pérdida de hábitat (Pettis *et al.*, 2012; Vanbergen, 2013; Goulson *et al.*, 2015; Çakmak & Sevençakmak, 2016; Dolezal *et al.*, 2019; Hristov *et al.*, 2020, 2021; Wood *et al.*, 2020; Simone-Fintrom *et al.*, 2021; Olynyk *et al.*, 2021). Particularmente, la disponibilidad de recursos florales es un factor clave para la preservación de la salud de las comunidades de abejas, aunque presentan un alto riesgo de transmisión de patógenos (Graystock *et al.*, 2020; Dalmon *et al.*, 2021). Por otra parte, los monocultivos como oferta floral junto con las modificaciones genéticas y la pulverización con agroquímicos afectan la calidad del polen y néctar generando un *stress* nutricional en las abejas que amenaza la sanidad de las colonias (Brodschneider & Crailsheim, 2010; Di Pasquale *et al.*, 2013). En conjunto con las exposiciones a agroquímicos, pueden afectar la respuesta inmunitaria, haciendo que las abejas sean más susceptibles a infecciones (di Prisco *et al.*, 2013; Goulson *et al.*, 2015; Pamminger *et al.*, 2018; Yordanova *et al.*, 2022). Las prácticas migratorias de trashumancia y el contexto del ambiente en el que se insertan, también son importantes al momento de evaluar posibles estresores y riesgo de transmisión de enfermedades (Simone-Finstrom *et al.*, 2016; Traynor *et al.*, 2016; Steinhauer *et al.*, 2021; Fuentes *et al.*, 2022). Adicionalmente, se encuentran expuestas al aumento y la propagación de cargas de patógenos y parásitos (Mondet *et al.*, 2014; Lanutti *et al.*, 2022), que pueden conducir a co-infecciones a través de múltiples rutas de infección (Dubois *et al.*, 2020; Yañez *et al.*, 2020; Al Naggar & Paxton, 2020), que generan gran impacto en las poblaciones (Jones & Brown, 2014; McMahon *et al.*, 2015; Carrillo-Tripp *et al.*, 2016; Remnant *et al.*, 2019; Faurot-Daniels *et al.*, 2020; Piot *et al.*, 2022). Aunque estos estresores pueden afectar la salud de los apiarios tanto solos como en asociación, (Steinhauer *et al.*, 2018; Nanetti *et al.*, 2021; Bordin *et al.*, 2022), generalmente no actúan de forma aislada. Sus interacciones pueden ser difíciles de predecir (Goulson *et al.*, 2015) ya que varían espacial y temporalmente y pueden producir efectos potencialmente sinérgicos (Pettis *et al.*, 2012; Dolezal *et al.*, 2019), resultando más dañinos (Goulson *et al.*, 2015; Goulson & Nicholls, 2022), convirtiéndose en un problema central para la salud de las abejas a nivel global.

1.1 Interacciones entre patógenos

La incidencia de una enfermedad en la colonia depende de varios factores, entre ellos la presencia de otros patógenos que propician la inmunosupresión social o individual, y la genética tanto del hospedador como del patógeno. Por lo general, existe una relación finamente equilibrada entre los patógenos y su huésped (Varela *et al.*, 2009; Deroost *et al.*, 2015; Gajda *et al.*, 2021), interactuando sin generar enfermedad. Sin embargo, cuando se altera el equilibrio dinámico natural, puede resultar en efectos nocivos (Woolhouse *et al.*, 2001;

Martin *et al.*, 2012). Por ello, comprender las interacciones entre huésped y patógeno es importante para desarrollar estrategias de manejo que mejoren la salud de las abejas (Ramos-Cuellar *et al.*, 2022).

Las abejas conviven con la exposición a una amplia gama de parásitos y patógenos, que desempeñan un papel importante en la dinámica poblacional (Goulson *et al.*, 2015). Las interacciones más estudiadas han sido las del ácaro *Varroa* y los virus que infectan a las colonias. *Varroa destructor* se considera hoy en día la principal amenaza biótica para *A. mellifera* (Moritz *et al.*, 2005; Le Conte *et al.*, 2010; Neumann & Carreck, 2010; Beaufreire *et al.*, 2022) debido a los efectos directos que produce, pero también a que debilita las colonias por inmunosupresión (Alaux *et al.*, 2011; Ramsey *et al.*, 2019) aumentando el impacto de las infecciones virales al actuar como puerto para la replicación y como vector biológico y mecánico de ciertos virus (Martin, 2001; Boecking & Genersch, 2008; Highfield *et al.*, 2009; Forsgren *et al.*, 2009; Rosenkranz *et al.*, 2010; Genersch & Aubert, 2010; Genersch *et al.*, 2010; de Miranda & Genersch, 2010; Di Prisco *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012; Nazzi *et al.*, 2012; Dainat *et al.*, 2012; Mondet *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2014; Antúnez *et al.*, 2015; McMenamin & Genersch, 2015; Di Prisco *et al.*, 2016; Tehel *et al.*, 2016; Wilfert *et al.*, 2016; Giacobino *et al.*, 2016b; Natsopoulou *et al.*, 2017; Martin & Brettell, 2019; Annoscia *et al.*, 2019; Levin *et al.*, 2019; Beaufreire *et al.*, 2020; Dittes *et al.*, 2020; Dubois *et al.*, 2020; Yañez *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2022; Ryabov *et al.*, 2022; Zachary *et al.*, 2022; Woodford *et al.*, 2022). Generalmente, el aumento de la proporción de ácaros en una región coincide con aumentos en la carga, patogenicidad y prevalencia de la mayoría de los virus (Chen & Siede, 2007; Ribière *et al.*, 2008; Antúnez *et al.*, 2015; Tantillo *et al.*, 2015). Annoscia *et al.* (2019), afirman que los niveles de infección viral más altos están vinculados a la replicación activa del virus dentro del ácaro infectado. En contraposición, altas prevalencias de algunos virus han sido halladas en ausencia del ácaro (Roberts *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018). Numerosos estudios demostraron su actividad en la replicación y transmisión de DWV, KBV, SBV, ABPV, CBPV, BQCV e IAPV (Bowen Walker *et al.*, 1999; Tentcheva *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; Chantawannakul *et al.*, 2006; Kevan *et al.*, 2006; Gauthier *et al.*, 2007; Celle *et al.*, 2008; Gisder *et al.*, 2009; Rosenkranz *et al.*, 2010; Currie *et al.*, 2010; Genersch & Aubert, 2010; Di Prisco *et al.*, 2011; Nazzi *et al.*, 2012; Dainat *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2013; Anido *et al.*, 2015; McMahon *et al.*, 2016; Wilfert *et al.*, 2016; Gisder *et al.*, 2018; Annoscia *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019; Beaufreire *et al.*, 2020; Dubois *et al.*, 2020; Burnham *et al.*, 2021; Woodford *et al.*, 2022), aunque el papel de *Varroa* en su propagación depende de la estación del año (Tentcheva *et al.*, 2004; Nazzi *et al.*, 2012; Mondet *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017; Morawetz *et al.*, 2018) y de la naturaleza de la relación (vector activo/pasivo, activador de infecciones, infecciones secundarias oportunistas, aumento de rutas de transmisión alternativas)(de Miranda *et al.*, 2010; de Miranda & Genersch, 2010). El grado de relación es más fuerte para aquellos virus que son transmitidos activamente por el ácaro, como los complejos de DWV y AIK, pero más débil para aquellos que se benefician de manera oportunista de las colonias debilitadas.

Además, existe una retroalimentación entre estos agentes infecciosos, ya que la inmunosupresión inducida por virus en los huéspedes puede favorecer el comportamiento alimentario y reproductivo de los ácaros (Di

Prisco *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; Ryabov *et al.*, 2022). De este modo, el control eficaz de los ácaros reduce los títulos de virus (Martin *et al.*, 2010; De la Mora *et al.*, 2020) y, el control independiente de los propios virus puede reducir la morbilidad asociada con las infestaciones de *Varroa* y la presión general de los patógenos sobre las colonias. En este contexto, la mayoría de los apicultores utilizan acaricidas sintéticos para controlar las infestaciones del ácaro, pero se ha reportado el desarrollo de resistencia (Maggi *et al.*, 2009, 2011; González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016; Aldea & Rodríguez, 2014; Locke, 2016), lo que compromete su eficacia (Wallner, 1999) y genera preocupación por la posibilidad del desarrollo de co-infecciones que afecten significativamente a las poblaciones de abejas.

En adición a la infestación por *Varroa*, las heridas que el ácaro realiza para alimentarse constituyen posibles sitios de entrada para otros patógenos (Bailey & Ball, 1991; Ball, 1988; Shen *et al.*, 2005a). Por ejemplo, se ha registrado correlación positiva entre las infecciones de *Vairimorpha* spp. y las infestaciones de *V. destructor* (Little *et al.*, 2015).

Por otra parte, usualmente los virus se encuentran presentes de forma latente y bajo condiciones de *stress* pueden volverse aparentes conllevando a infecciones de otros patógenos que pueden interactuar con ellos aumentando su efecto patogénico (Yang *et al.*, 2005; Tantillo *et al.*, 2015; Di Prisco *et al.*, 2016; Castelli *et al.*, 2021; Lanutti *et al.*, 2022). DWV es el virus más estrechamente asociado con *Varroa* y su actual prevalencia, abundancia y virulencia parecen deberse casi exclusivamente a su transmisión via este vector (Mondet *et al.*, 2014; Emsen *et al.*, 2015; De la Mora *et al.*, 2020), aunque las diferencias en las cargas halladas también pueden deberse a interacciones con otros microorganismos patógenos (Eiri *et al.*, 2015; Urbietta-Magro *et al.*, 2019) o con la microbiota intestinal del huésped (Dosch *et al.*, 2021). Adicionalmente, varios informes vincularon brotes de BQCV con la infección por *V. apis* (Bailey *et al.*, 1983; Allen & Ball, 1996; Tentcheva *et al.*, 2004; Berényi *et al.*, 2006) y *V. ceranae* (Bacandritsos *et al.*, 2010; Dainat *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015; Chagas *et al.*, 2021) e investigaciones más recientes sugieren que los efectos de ambos patógenos sobre la longevidad de las abejas son aditivos (Retschnig *et al.*, 2014). La nosemosis también ha sido relacionado a otras infecciones virales como el virus Y, y el virus filamentoso (Fries *et al.*, 2013), y se han informado interacciones sinérgicas con CBPV (Toplak *et al.*, 2013), siendo significativamente más dañino en co-infecciones con BQCV (Chen *et al.*, 2007). *Vairimorpha ceranae* podría causar debilitamiento y depresión del sistema inmune (Antúnez *et al.*, 2009), favoreciendo infecciones virales que bajo ciertas condiciones llevan a la colonia al colapso (Betti *et al.*, 2014). Aunque el estado nutricional mejora la supervivencia de los huéspedes infectados en la interfaz microsporidio-virus (Zheng *et al.*, 2014; Tritschler *et al.*, 2017), interacciones de este tipo crean efectos epidemiológicos impredecibles (DaPlama *et al.*, 2010; Syller, 2012).

La susceptibilidad a la infección por bacterias no escapa a la regla general y depende tanto de la nutrición, el clima, la edad, el comportamiento y la genética del hospedador (Forsgren, 2010), así como de la cepa y dosis del patógeno (Budge *et al.*, 2010; Milbrath, 2021). La carga bacteriana suele presentar gran diversidad a nivel de colonia, probablemente debido a una variedad de factores que incluyen los antecedentes genéticos del

hospedador, co-infecciones específicas, exposición a agroquímicos o diferencias en la microbiota (Erban *et al.*, 2017; Lewkowski & Erler, 2019; Wood *et al.*, 2020; Floyd *et al.*, 2020; Milbrath, 2021). Los agentes infecciosos que afectan a la cría generalmente emergen de forma secundaria a una infección por patógenos más prevalentes como *V. destructor* y *V. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2012), que pueden ser responsables de la inmunosupresión de la colonia (Yang & Cox-Foster, 2005; Antúnez *et al.*, 2009) y propiciar el ingreso de otros patógenos/parásitos (Garrido-Bailón *et al.*, 2012).

Estas interacciones sugieren que las infecciones múltiples crean oportunidades para interacciones entre patógenos con efectos aditivos y sinérgico tanto a nivel individual como de colonia (Nazzi *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2016) y distintos mecanismos biológicos podrían estar en juego en dichas interacciones (Castelli *et al.*, 2021).

1.2. Relación entre origen genético de las abejas y presencia de patógenos

La susceptibilidad de las abejas melíferas a los patógenos se ve afectada por varios factores, incluidos sus antecedentes genotípicos. Numerosos estudios se han centrado en las interacciones abeja-parásito/patógeno, aunque principalmente han analizado los efectos genotípicos del parásito/patógeno (Genersch *et al.*, 2005) en lugar de las interacciones genotípicas (Evison *et al.*, 2013). Debido a su sistema de apareamiento poliándrico, las colonias de *A. mellifera* muestran heterogeneidad genética entre individuos que emergen de la misma reina, cobrando gran relevancia al estudiar patógenos (Kraus *et al.*, 1998; Van Baalen & Beeckman, 2006; Delaplane *et al.*, 2015; Simone-Finstrom *et al.*, 2016; Castelli *et al.*, 2021). En particular, se han hallado variaciones significativas en las copias del genoma de virus y de cargas de *P. larvae* y *A. apis* entre subfamilias con diferente perfil genético dentro de una colonia (Oldroyd & Palmer, 2003; Invernizzi *et al.*, 2009; Castelli *et al.*, 2021). La diversidad genética influye en una amplia gama de fenotipos en las colonias (Oxley & Oldroyd, 2010), todos esenciales para la supervivencia y la respuesta al estrés ambiental (Espregueira-Themudo *et al.*, 2020). Sin embargo, la colonia suele considerarse como una unidad para la epidemiología, sugiriendo que las cargas de patógenos son uniformes entre los individuos de la misma colmena, provenientes de una misma reina y pertenecientes a un mismo linaje materno. Los comportamientos de defensa son muy variables entre los linajes evolutivos (Masaquiza-Moposita *et al.*, 2020). Particularmente las abejas de ascendencia africana divergen de las abejas de ascendencia europea en una serie de rasgos como tasas de reproducción más altas, tiempos de desarrollo más rápidos, inversión proporcionalmente mayor en la producción de zánganos, mayor defensa del nido y enjambres más frecuentes, que pueden haberles conferido una ventaja ecológica (Winston, 1992; McNally & Schneider, 1992a, 1992b, 1996; Fewell & Bertram, 2002; Breed *et al.*, 2004), particularmente frente a la tolerancia a patógenos. Las ventajas que proporciona la ascendencia europea son menos claras, aunque Nelson *et al.* (2017) y Harpur *et al.* (2020) demostraron que tanto la ascendencia africana como la europea subyacen a las características de defensa del nido.

Las abejas dependen de la autodefensa o la resistencia natural para contrarrestar las enfermedades (Akinwande *et al.*, 2014), por lo que la evaluación del comportamiento higiénico es la clave de la tolerancia y resistencia general (Masaquiza-Moposita *et al.*, 2020). La habilidad que tienen las obreras para discriminar a partir de su sensibilidad olfatoria (Plettner *et al.*, 2017), crías normales y anormales a una baja intensidad de estímulo (Xonis *et al.*, 2015), desopercular y remover crías enfermas, muertas o parasitadas (Rothenbuhler, 1964; Arathi *et al.*, 2000; Vaziritabar *et al.*, 2016), es un rasgo genético heredable (Medina-Flores *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016). Por ejemplo, la relación abeja-*Varroa* ha sido una de las más estudiadas. Algunas poblaciones de abejas muestran mecanismos que le permiten coexistir con el ácaro sin requerir ningún tratamiento acaricida (Geffre *et al.*, 2021). Sin embargo, Delaplane *et al.* (2005) demostraron, a partir de análisis del grado de expresión del comportamiento higiénico, que la apicultura sin tratamiento no es una opción para todas las colonias. Las infestaciones en linajes de abejas melíferas nativas europeas y occidentales derivadas de ellas, generalmente conducen al crecimiento de la población de ácaros alcanzando niveles que conducen a la muerte de las colonias hospedadoras en uno o dos años (Martín, 1998; Calis *et al.*, 1999). América del Sur es considerado un lugar único para estudiar las interacciones entre *V. destructor* y *A. mellifera*, debido a que coexisten varios linajes del huésped con diferentes niveles de resistencia a las infestaciones de ácaros (Nelson *et al.*, 2017; Wallberg *et al.*, 2014). Actualmente, la presencia de *Varroa* en el continente se relaciona directamente con la pérdida de colonias (Maggi *et al.*, 2013, 2016; Antúnez *et al.*, 2015), aunque muchas subespecies de abejas de origen africano son capaces de tolerar las infestaciones (Guzman-Novoa *et al.*, 1996; Muli *et al.*, 2014; Goulson *et al.*, 2015; Invernizzi *et al.*, 2015; Graciano Villa, 2018; Düttmann *et al.*, 2021). Luego de su introducción y expansión, el ácaro comenzó a ser menos virulento en las regiones tropicales y subtropicales de Argentina, Brasil, Uruguay y Venezuela donde se encontraban abejas africanizadas, en comparación con las regiones que registran mayores pérdidas en climas templados y fríos donde son frecuentes los híbridos de abejas de linajes europeos (Moretto *et al.* 1991; Casanova, 2000; Moretto, 2002; Vandame & Palacio, 2010; Invernizzi *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014; Düttmann *et al.*, 2021). La menor infestación observada en climas subtropicales puede deberse a una mayor presencia de abejas africanizadas en la zona (Garrido *et al.*, 2003; Bianconi *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2015; Guzmán-Novoa *et al.*, 2019) debido a la mayor capacidad de estas abejas para mantener regulada la población del ácaro respecto de las abejas europeas en América del Sur, que radica en mecanismos de defensa natural, tales como el *grooming* y el comportamiento higiénico, la remoción de larvas infestadas, una baja atraktividad de la cría, un menor tiempo de desarrollo y la supresión o reducción de la tasa de reproducción de ácaros, que han conducido al desarrollo de tolerancia a la infestación (Moretto *et al.*, 1991, 1993, 1999; Guzmán-Novoa *et al.*, 1996, 1999, 2012; Corrêa-Marques & De Jong, 1998; Rosenkranz, 1999; Aumeier *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2000; Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2001; Rinderer *et al.*, 2001; Vandame *et al.*, 2000, 2002; Corrêa-Marques, 2003; Raina & Fries, 2004; Harbo & Harris, 2005; Mondragón *et al.*, 2005, 2006; Spivak *et al.*, 2009; Büchler *et al.*, 2010; Calderón *et al.*, 2010; Frazier *et al.*, 2010; Rinderer *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2011, 2020; Verde *et al.*, 2013; Medina-

Flores *et al.*, 2014; Invernizzi *et al.*, 2015; Strauss *et al.*, 2015; Danka *et al.*, 2016; Hunt *et al.*, 2016; Nganso *et al.*, 2017; Cheruiyot *et al.*, 2018; Graciano Villa, 2018; Morfin *et al.*, 2019; Düttmann *et al.*, 2021). Además, la fuga (comportamiento de enjambre, típico de las abejas tropicales) contribuye a reducir significativamente los niveles de infestación (Le Conte *et al.*, 2020), y consecuentemente se reduce la prevalencia de virus (Strauss *et al.*, 2013). Sin embargo, ciertas poblaciones de abejas de linaje europeo han mostrado presentar tolerancia a *Varroa* (Bouga *et al.*, 2011; Acevedo-González *et al.*, 2019; Morfin *et al.*, 2019; Odemer *et al.*, 2020; Moro *et al.*, 2021a, 2020b). Los rasgos de *A. mellifera* que limitan el éxito reproductivo de *V. destructor* son genéticamente heredables dentro de la población (Lodesani *et al.*, 2002; Fries *et al.*, 2006; Locke *et al.*, 2011; Locke, 2016; Maucourt *et al.*, 2020; van Alphen *et al.*, 2020). Es probable que los alelos de los rasgos de comportamiento higiénico y acicalamiento estuvieran presentes en frecuencias superiores en las abejas de origen africano respecto de las encontradas en las abejas melíferas europeas y hayan conducido a la generación de resistencia por selección natural en las poblaciones de África y América del Sur (van Alphen *et al.*, 2020).

Por otra parte, la influencia de la ascendencia africana en el nivel de resistencia de las colonias a otras enfermedades como las causadas por virus y *Vairimorpha* spp. no ha sido ampliamente estudiada (Ramos-Cuellar *et al.*, 2022). Sin embargo, el origen genético de las abejas es considerado un factor importante para las infecciones de *Vairimorpha* spp., ya que las colonias de linaje africano presentan un menor nivel de infección, tienen un mayor tamaño poblacional y producen más miel que las colonias europeas (Mendoza *et al.* 2014); y, adicionalmente, se reportaron tasas más bajas de replicación de DWV y BQCV en abejas de linaje africano, sugiriendo diferencias entre linajes en la resistencia (Hamiduzzamann *et al.*, 2015). Por otra parte, Evans *et al.* (2013) documentaron que la resistencia a virus tiene un fuerte componente genético en *A. mellifera* a partir de la supresión de la infección *in ovo*.

El mecanismo inmunológico responsable de la defensa de la colonia y de que los individuos enfrenten amenazas externas se caracteriza por la plasticidad (Mondet *et al.* 2015) y, por lo tanto, la selección artificial de poblaciones de abejas (Hopkins *et al.* 2012) es un mecanismo interesante para afrontar las amenazas bióticas (Lin *et al.* 2023a) y lograr resistencia a ellas. Los mecanismos de resistencia y tolerancia abarcan una amplia gama de comportamientos, que muy probablemente no funcionen por sí solos, sino en combinación, y la importancia de las adaptaciones específicas puede variar según el entorno (Mondet *et al.*, 2020).

Los estudios comparativos entre colonias que expresan rasgos específicos son de gran importancia biológica para comprender los mecanismos de resistencia y/o tolerancia a patógenos/parásitos, así como su heredabilidad y viabilidad para el desarrollo e implementación de programas de mejoramiento basados en la selección de caracteres fenotípicos y herramientas genéticas cuantitativas (Büchler *et al.*, 2010; de la Mora *et al.*, 2020; Le Conte *et al.*, 2020).

Los estudios sobre la calidad de las condiciones ambientales brindan información sobre su impacto en la salud de las abejas. Sin embargo, el papel de patógenos como los microsporidios, los virus y ácaros en la mortalidad

de las colonias y las relaciones entre su prevalencia y abundancia, no se han dilucidado completamente (Evans & Schwarz, 2011; Kurze *et al.*, 2016; Bordin *et al.*, 2022), así como tampoco las interacciones de estos patógenos con los diversos linajes evolutivos de las abejas hospedadoras. Teniendo en cuenta que el curso de las infecciones, su incidencia, gravedad y resistencia del huésped, varían principalmente según las diferentes subespecies de abejas, cepas de patógenos y condiciones ambientales (Aronstein & Murray, 2010; GuzmanNovoa *et al.*, 2012; Fries *et al.*, 2013; Mortensen *et al.*, 2016; Galajda *et al.*, 2021), se analizó la asociación entre las diversas enfermedades halladas en el país en relación al linaje materno al que pertenecen las colonias y, las relaciones entre enfermedades que presentaron mayor prevalencia.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar las interacciones entre *V. destructor*, *Vairimorpha* spp., virus ARN y *M. plutonius* para discutir las implicancias de las asociaciones entre ellos, de acuerdo a las regiones productivas.
2. Evaluar las interacciones entre *V. destructor*, *Vairimorpha* spp., virus ARN, *M. plutonius* y los linajes maternos africano y europeo a los que pertenecen las poblaciones analizadas.

1.4. HIPÓTESIS

1. Las interacciones entre patógenos dependen principalmente de su naturaleza y de las características de la región en la que se encuentran.
2. Las poblaciones de abejas de linaje materno africano presentan una mayor resistencia o grado de tolerancia frente a las infecciones de patógenos respecto de las abejas de linaje europeo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software RStudio versión 2023.12.1+402. Para evaluar si existe asociación entre los diversos patógenos hallados, y con los linajes maternos de las poblaciones estudiadas, se utilizó la prueba exacta de Fisher para cada interacción, tomando como variables categóricas la detección/no detección de cada uno de los agentes etiológicos estudiados y la categorización de los linajes maternos para cada muestra, obtenidos con las metodologías detalladas en la sección materiales y métodos de los capítulos 1 y 2. Se utilizaron tablas de contingencia de 2x2, excluyendo las muestras que no pudieron ser analizadas para alguna de las variables a comparar, con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Los valores de *p* se obtuvieron con un 95% de confianza y el efecto del tamaño de la muestra se calculó con el coeficiente Phi y con el coeficiente Cramer's. A partir de esta prueba se analizó la dependencia de las variables y su fuerza de asociación.

Se realizaron pruebas de asociación entre todos los patógenos, con diferenciación en las detecciones de los virus más prevalentes en el país. De este modo, se realizaron 13 evaluaciones para la independencia de la detección/no detección entre pares de patógenos (incluyendo *V. destructor*, Virus en general, IAPV, DWV, BQCV, *Vairimorpha* spp. y *M. plutonius*). La evaluación de la asociación entre patógenos y linajes maternos, se realizó para cada uno de los patógenos detectados y los linajes maternos europeo y africano, incluyendo todos los haplogrupos correspondientes a cada linaje sin distinción entre ellos. Adicionalmente se emplearon análisis estadísticos descriptivos, con aplicación de técnicas gráficas para mostrar el comportamiento de las variables estudiadas.

3. RESULTADOS

Las detecciones de más de un patógeno/parásito se presentaron en 211 de las 395 muestras contrastadas, con hasta 7 detecciones positivas por muestra, particularmente en la región CENTRO. Los datos de coinfecciones se encuentran representados en la Figura 3.1, discriminados por co-infecciones y región productiva.



Figura 3.1 – Tabla de co-infecciones por región y gráfico de barras de frecuencia acumulada para las detecciones de patógenos y parásitos por región productiva. La referencia indica la cantidad de detecciones positivas, siendo 0 ausencia de detecciones. Los virus se encuentran contabilizados de manera individual en el gráfico.

Los resultados de la evaluación de asociación entre patógenos mostraron independencia de la detección/no detección en 11 de los pares analizados por el test de Fisher, siendo las excepciones las comparaciones *Varroa*-virus ($p=0,00243$) y *Varroa*-IAPV ($p=0,004297$)(Figura 3.2).

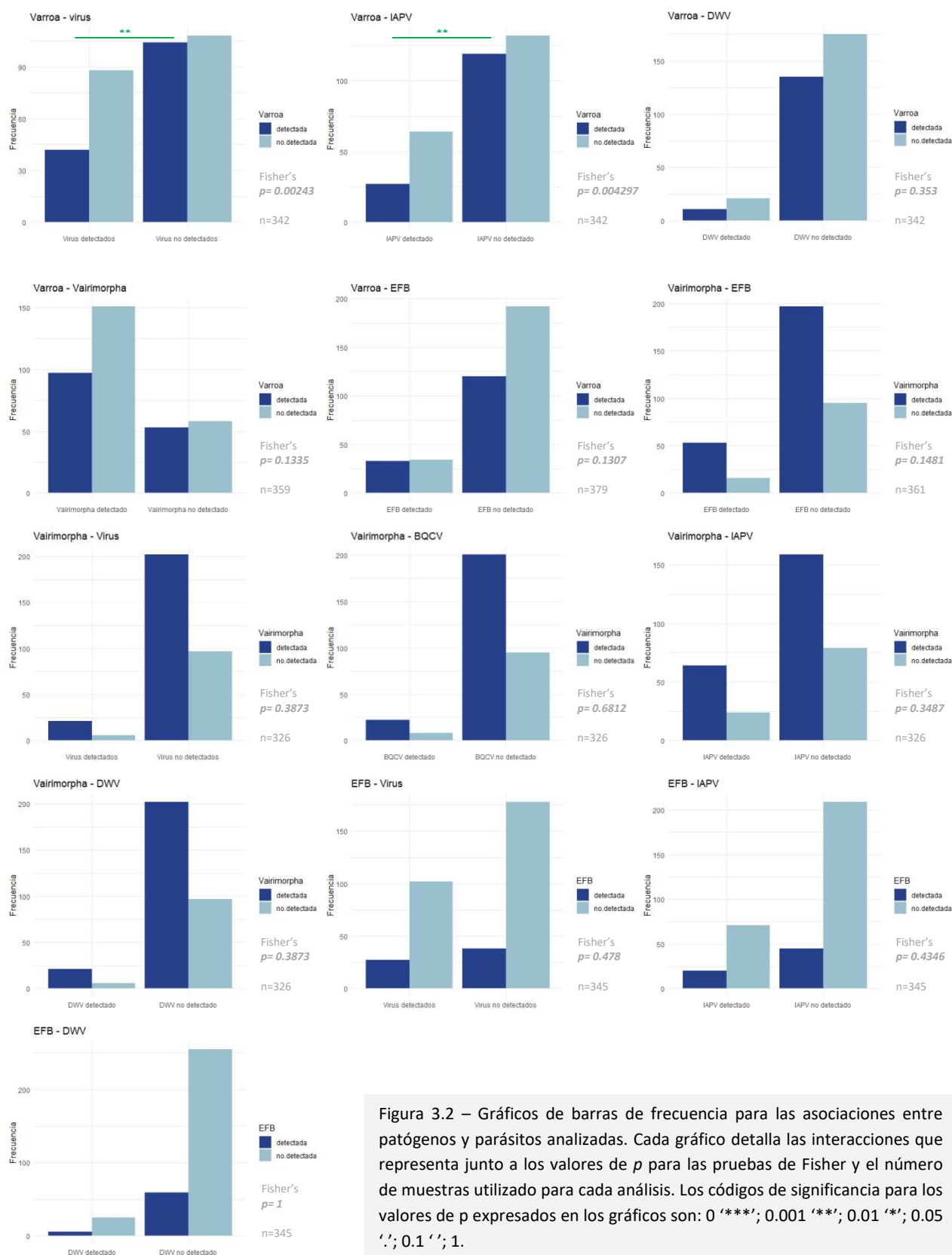


Figura 3.2 – Gráficos de barras de frecuencia para las asociaciones entre patógenos y parásitos analizadas. Cada gráfico detalla las interacciones que representa junto a los valores de p para las pruebas de Fisher y el número de muestras utilizado para cada análisis. Los códigos de significancia para los valores de p expresados en los gráficos son: 0 '***'; 0.001 '**'; 0.01 '*'; 0.05 '.'; 0.1 ' '; 1.

La distribución de cada patógeno fue registrada según las categorías de análisis, por región productiva y discriminada por linaje materno. Para *V. destructor*, se registraron las frecuencias de las 10 categorías analizadas para las poblaciones de origen europeo y africano para el país (Figura 3.3). El mayor porcentaje de muestras que presentaron algún grado de infestación por *Varroa*, pertenecen al linaje materno europeo, mientras que la mayor pertenencia a los haplogrupos mitocondriales africanos, se observó en las muestras de la categoría 10-15% correspondiente a dichos porcentajes de infestación por el ácaro.

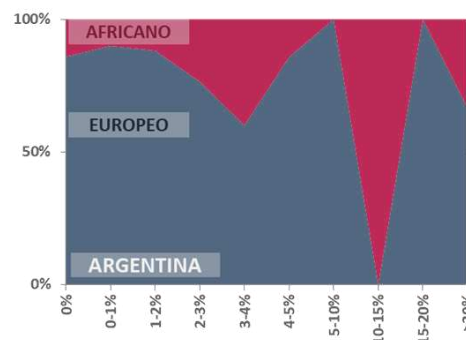


Figura 3.3 – Gráfico de porcentajes acumulados para cada categoría de detección de *Varroa* discriminado por linaje materno. Las categorías corresponden a los porcentajes de infestación del ácaro.

Para el análisis de virus, se registraron las frecuencias tanto de cada uno de los virus analizados como de las infecciones simples y co-infecciones (Figura 3.4a), discriminadas por linaje materno para las poblaciones analizadas en el país. Los seis virus hallados en este análisis se encontraron tanto en poblaciones de abejas de origen europeo como africano, a excepción de CBPV que solo estuvo presente en poblaciones de origen europeo. Las muestras pertenecientes al linaje materno africano presentaron mayor frecuencia de co-infecciones, y las de linaje europeo, mayor frecuencia de infecciones simples en el análisis total. Las infecciones simples y co-infecciones para cada región productiva se encuentran en la Figura 3.4b.

Figura 3.4a – Gráfico de barras para infecciones simples y co-infecciones por linaje materno (izquierda). Gráfico de porcentajes acumulados para cada uno de los virus analizados discriminado por linaje materno (derecha).

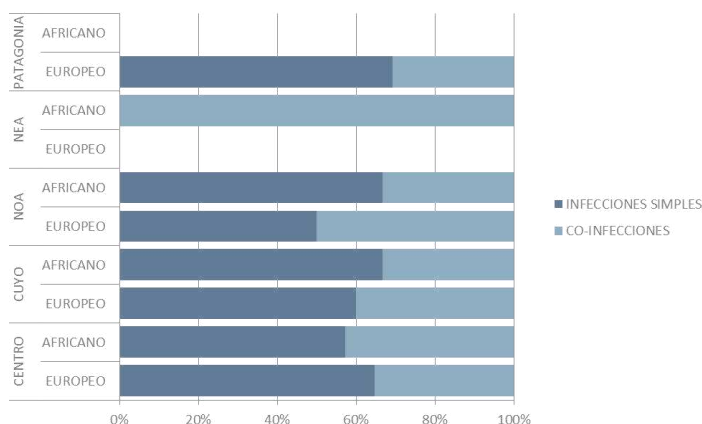
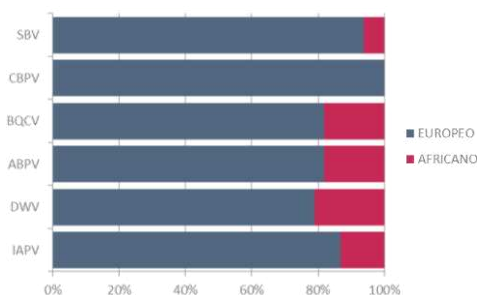
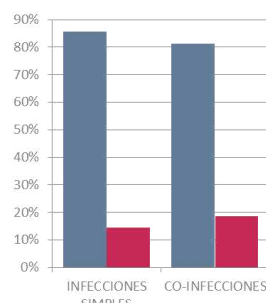


Figura 3.4b – Gráfico de porcentajes acumulados para infecciones simples y co-infecciones discriminado por linaje materno y por región productiva.

Para *Vairimorpha* spp., se registraron las frecuencias de las categorías de abundancia media DESPRECIABLE, MUY LEVE, LEVE, MEDIO, GRAVE y MUY GRAVE discriminadas por linaje materno para el país y por región productiva (Figura 3.5 y Figura 3.6). Las mayores frecuencias registradas para los haplogrupos de linaje materno europeo fueron en el nivel DESPRECIABLE, mientras que para las muestras de origen materno africano fueron en el nivel GRAVE, para la totalidad de las muestras analizadas en el país.

En el escenario regional, cada zona presentó un patrón de frecuencias diferente para cada categoría según el origen mitocondrial de la muestra, graficado en el mapa de la Figura 3.6.

Figura 3.5 – Gráfico de porcentajes acumulados para cada categoría de detección de *Vairimorpha* spp. discriminadas por linaje materno para el total de las muestras.

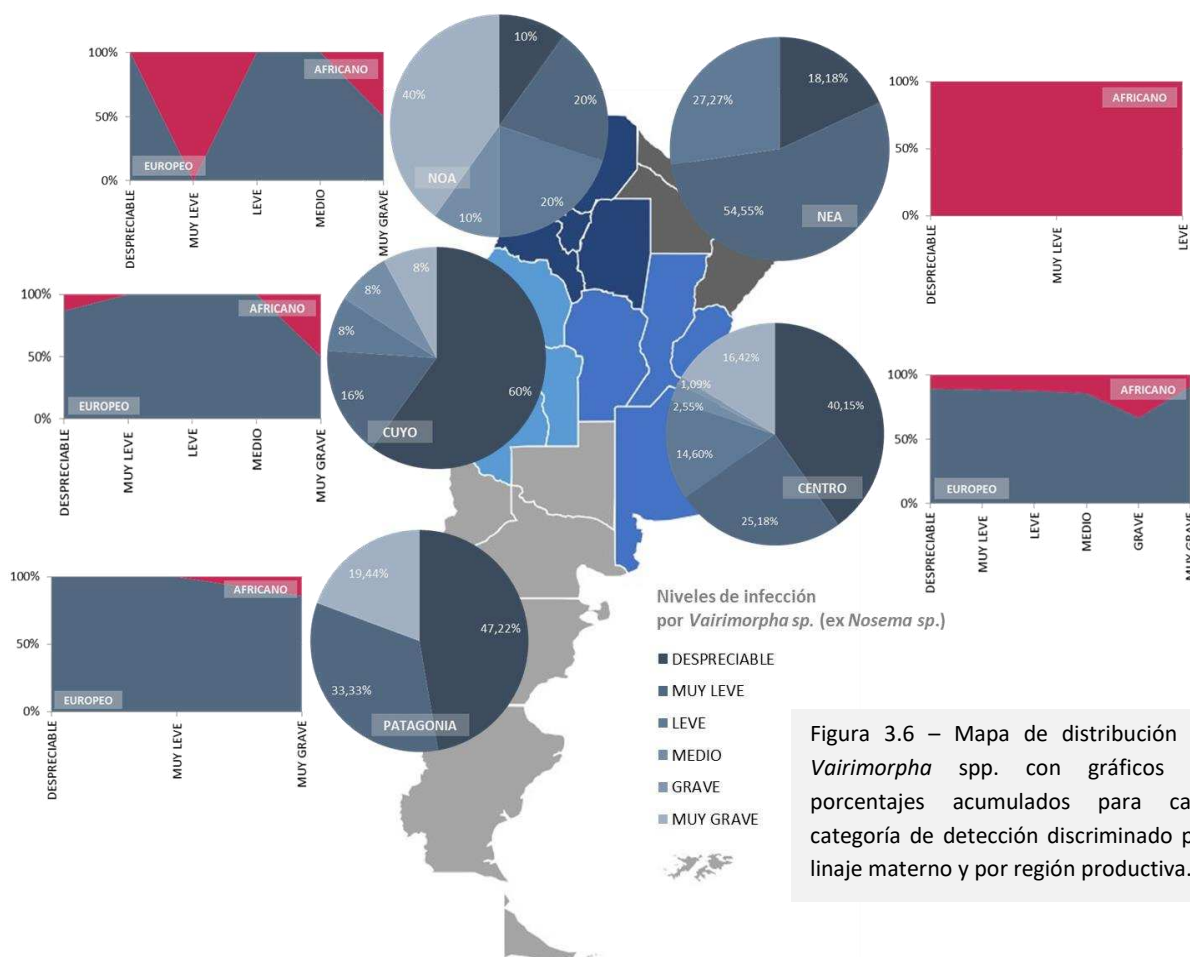
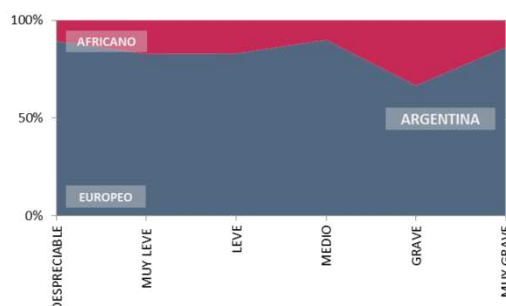


Figura 3.6 – Mapa de distribución de *Vairimorpha* spp. con gráficos de porcentajes acumulados para cada categoría de detección discriminado por linaje materno y por región productiva.

Las frecuencias de detección de *M. plutonius* se registraron discriminando los linajes maternos de pertenencia de cada muestra, para el país y para cada región productiva (Figura 3.7a y 3.7b). Las frecuencias de detección/no detección determinadas para el país son similares para ambos linajes, mientras que en la zonificación por región productiva, se encuentran diferencias en la distribución de la detección del patógeno.

Figura 3.7a – Detección de *M. plutonius* con gráfico de porcentaje discriminado por linaje materno.

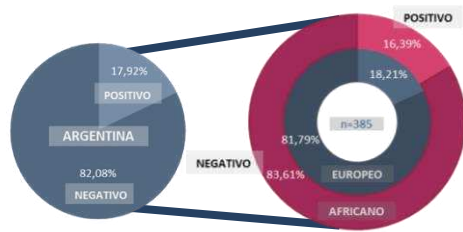
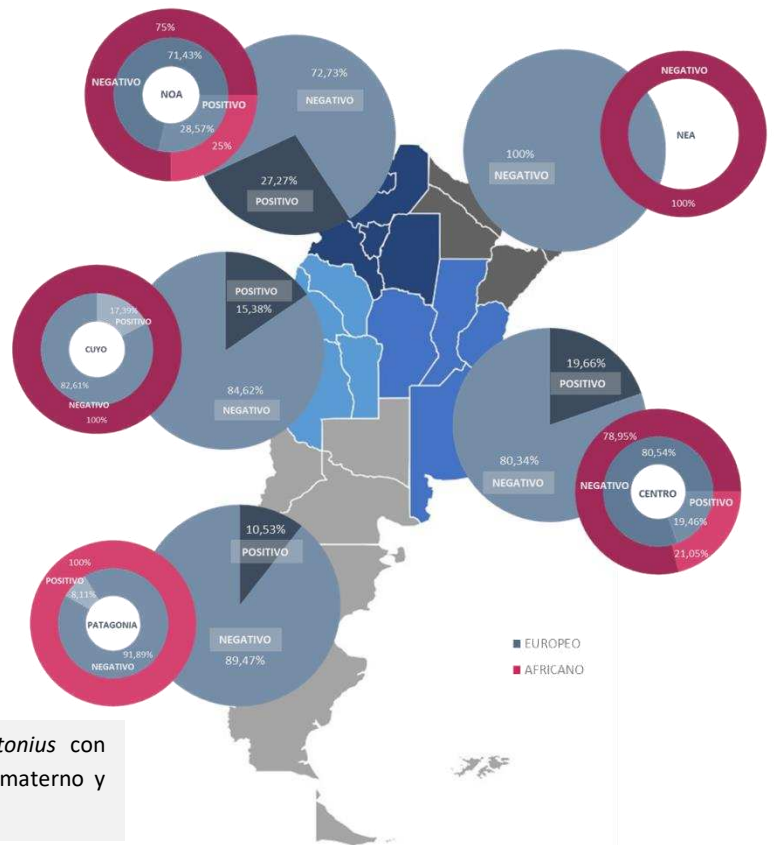


Figura 3.7b – Mapa de detección de *M. plutonius* con gráficos de porcentajes discriminado por linaje materno y por región productiva.



Sin embargo, pese a las diferencias expuestas en los análisis descriptivos de los datos, la evaluación de la asociación entre patógenos y linajes maternos analizadas con la prueba de Fisher, mostraron independencia de la detección/no detección de *V. destructor*, *Vairimorpha* spp., *M. plutonius* y virus respecto de la pertenencia a un origen materno en particular (Figura 3.8).

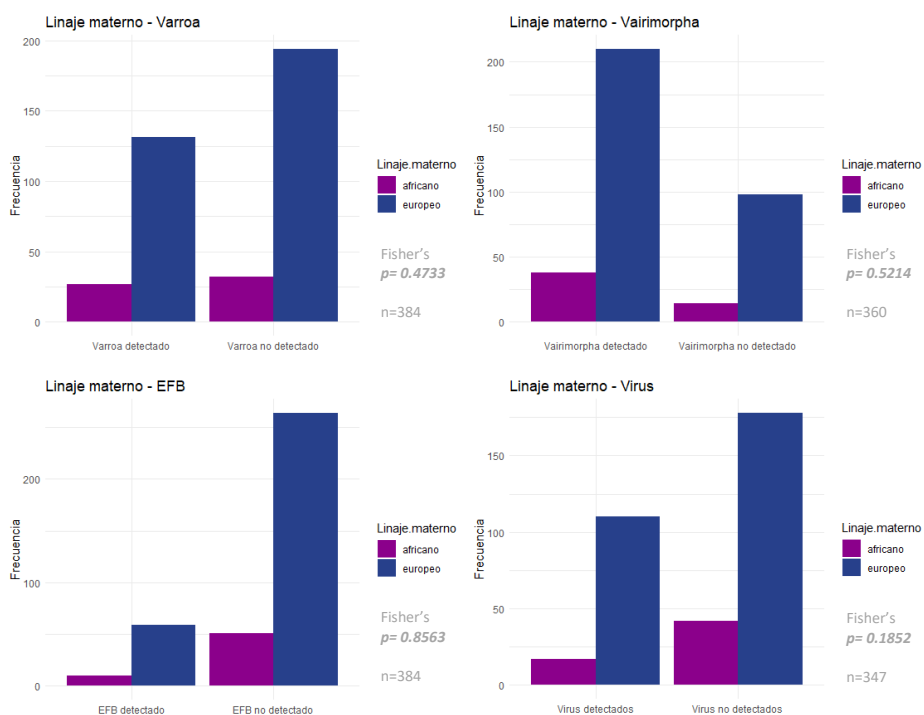


Figura 3.8 – Gráficos de barras de frecuencia para las asociaciones entre patógenos y linajes maternos. Cada gráfico detalla las interacciones que representa junto a los valores de p para las pruebas de Fisher y el número de muestras utilizado para cada análisis.

4. DISCUSIÓN

4.1 Interacciones entre patógenos

Las infecciones múltiples con diferentes patógenos son comunes en las colonias y han sido registradas por numerosos autores en todo el mundo. Las detecciones de más de un patógeno/parásito se presentaron en 211 de las 395 muestras contrastadas, con hasta 7 detecciones positivas por muestra. Las co-infecciones con mayor representación regional fueron *Vairimorpha spp.*-virus (en las 5 regiones productivas analizadas) y, *V. destructor*-*Vairimorpha spp.* junto con *V. destructor*-*Vairimorpha spp.*-virus-*M. plutonius* (en 3 regiones).

Como fue presentado en el capítulo 2, tanto las poblaciones de abejas como las de *V. destructor* frecuentemente se encuentran co-infectadas con múltiples virus (Bailey & Ball, 1991; Tentcheva *et al.*, 2004a; Shen *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 2007) y la combinación del ácaro con uno o más factores estresantes es considerada una de las principales causas de la disminución de colonias (Van Dooremalen *et al.*, 2013), con un papel importante en la transmisión y replicación de ciertos virus (Anido *et al.*, 2015; Annoscia *et al.*, 2019). Los resultados de la evaluación entre la detección de *Varroa* y virus presentados en este capítulo, mostraron una relación de asociación entre la presencia de *Varroa* y la detección de virus en general. Antúñez *et al.* (2015) reportaron que es factible detectar una serie de virus en las colonias durante todo el año (ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV), aunque las mayores prevalencias y cargas virales coinciden con la infestación por *V. destructor*. Sumado a ello, Annoscia *et al.* (2019) afirman que los niveles de infección viral más altos están vinculados a la replicación activa del virus dentro del ácaro infectado. Contrariamente a lo esperado, teniendo en cuenta que la transmisión mediada por la vectorización de *V. destructor*, generalmente explica la mayor prevalencia de DWV en las colonias (Tentcheva *et al.*, 2004; Berényi *et al.*, 2006; Chen & Siede, 2007; de Miranda & Genersch, 2010; Mondet *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2014; Anido *et al.*, 2015; Giacobino *et al.*, 2016b; Burnham *et al.*, 2021), los resultados de este análisis muestran una asociación positiva entre *Varroa* e IAPV, mientras que los resultados de la detección de *Varroa* y DWV mostraron independencia. Salina *et al.* (2023) reportaron la detección de cada uno de los virus estudiados independientemente de la presencia de *V. destructor* para colonias de la provincia de Buenos Aires (entre los que se encontraba IAPV), a excepción de la asociación directa de DWV con el grado de infestación del ácaro, que no fue registrada en los análisis realizados para este capítulo. Estas diferencias podrían estar sugiriendo un cambio en el ambiente, que influye en las relaciones entre patógenos, teniendo en cuenta que el virus con mayor prevalencia fue IAPV, desplazando a DWV al segundo lugar (Resultados Capítulo 2), y que ambos virus son vectorizados por *Varroa*, pudiendo existir competencia entre ellos (Doublet *et al.*, 2015) favorecida por las condiciones ambientales, o en la relación *Varroa*-virus y las posibles vías de transmisión. De igual modo, Bordin *et al.* (2022) reportan presencia de colonias que presentan infecciones virales, con niveles bajos de infestación de ácaros, que sugieren otras vías de replicación y transmisión. Sumado a ello, las poblaciones de ácaros de Uruguay, Chile y Argentina no presentan una fuerte estructuración genética, lo que indica el predominio de un único linaje invasor (Solignac

et al., 2005; Strapazzon *et al.*, 2009; Maggi *et al.*, 2012; Muntaabski *et al.*, 2020; Mendoza *et al.*, 2020; Beaurepaire *et al.*, 2022), que a su vez, se encuentra expuesto a una constante utilización de acaricidas que contribuye a eliminar la presión selectiva de la infestación natural, e impide los procesos co-evolutivos hacia una relación estable huésped-parásito (Neumann & Blacquièrre, 2016). También, se han registrado poblaciones de ácaros con desarrollo de resistencia (Maggi *et al.*, 2009, 2011; González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016, 2018; Locke, 2016; Mitton *et al.*, 2018), aunque no se conocen las implicancias que puede tener en la transmisión de enfermedades o en la replicación de virus.

Vairimorpha spp. puede afectar negativamente a la salud de las abejas melíferas causando debilitamiento y depresión del sistema inmune aumentando la susceptibilidad a otros patógenos (Cox-Foster *et al.*, 2007; Antúnez *et al.*, 2009), favoreciendo, por ejemplo, las infecciones virales (Betti *et al.*, 2014). Numerosos informes vincularon brotes de BQCV con la infección producida por *Vairimorpha spp.* (Tentcheva *et al.*, 2004; Berényi *et al.*, 2006; Bacandritsos *et al.*, 2010; Dainat *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015; Chagas *et al.*, 2021). Sin embargo, las coinfecciones con mayor prevalencia reportadas por Bordin *et al.* (2022) incluyeron a *V. ceranae* y ciertos virus, y aunque no hallaron asociación estadísticamente significativa con BQCV, si lo hicieron para el análisis del microsporidio con ABPV y DWV. De manera similar, otros estudios informaron interacciones particulares, entre *V. ceranae* y DWV (Doublet *et al.*, 2015; Traynor *et al.*, 2016; Tritschler *et al.*, 2017;), al igual que Mayack *et al.* (2022), que hallaron una correlación positiva significativa entre las colmenas infectadas con *V. ceranae* e IAPV. Los resultados arrojados por el *test* de Fisher para la evaluación entre la detección de virus y *Vairimorpha spp.*, como de virus y *M. plutonius*, mostraron independencia entre la presencia de estos patógenos en las colmenas. Particularmente fueron analizadas las relaciones *Vairimorpha spp.*-BQCV, *Vairimorpha spp.*-IAPV, *Vairimorpha spp.*-DWV, *M. plutonius*-IAPV y *M. plutonius*-DWV que mostraron independencia entre las detecciones de los patógenos, resultando similares a los resultados reportados por Simone-Finstrom *et al.* (2021) quienes tampoco hallaron correlación entre los virus analizados y *Vairimorpha spp.*, ni entre virus y *M. plutonius*, y por Rodríguez *et al.* (2012) que hallaron coinfecciones de *V. ceranae* con BQCV, DWV y SBV, pero sin registrar asociaciones estadísticamente significativas. Estos resultados podrían analizarse desde la presencia de niveles generalmente bajos de abundancia media de *Vairimorpha spp.* hallados en el país (Resultados Capítulo 2), pese a su elevada prevalencia, que podrían estar indicando un cierto grado de tolerancia al microsporidio o una reducción de su abundancia por crecimiento poblacional del hospedador, que no conducirían al debilitamiento de las colonias. De igual modo, el alto porcentaje de prevalencia de *M. plutonius* en el país (Resultados Capítulo 2), no parece tener una influencia negativa en cuanto a las co-infecciones halladas, aunque cabe destacar que en este trabajo sólo se presentan las detecciones, sin determinación de la carga de patógenos, y para abejas muestreadas en primavera.

Algunos autores sugieren una fuerte influencia de otros patógenos, particularmente *V. destructor*, en la presencia de *V. ceranae* y proponen que el parasitismo causado por el ácaro es capaz de modificar el ciclo

anual de *Vairimorpha spp.* (Mariani *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2012a; Pacini *et al.*, 2016b, 2021), por lo que el control de las infestaciones de *Varroa* puede ser vital para mitigar la infección del microsporidio y el manejo de las infecciones de este último puede ser beneficioso para controlar la propagación de los ácaros (Little *et al.*, 2016). De acuerdo con los reportes de Lopes *et al.* (2022) para las islas Azores, las poblaciones de abejas en donde se introdujo por primera vez *V. destructor* registraron una gran proporción de colonias infectadas con *V. ceranae* y, según Giacobino *et al.* (2018) en condiciones naturales contrastantes como las del norte de Argentina, principalmente en Chaco, la aparición de *Vairimorpha spp.* parece estar asociada a *Varroa* y las características medioambientales resultan ser las principales impulsoras de dicha asociación. Sin embargo, y aunque tanto el microsporidio responsable de la nosemosis como el ácaro causal de la varroasis son los agentes etiológicos más prevalentes en el país (Resultados Capítulo 2), los resultados arrojados por el test de Fisher no mostraron asociación en la presencia de estos patógenos en las colmenas analizadas, pudiendo deberse a algún tipo de inmunidad expresado por las abejas en respuesta a la infección primaria.

Es importante destacar la imposibilidad de inferir causalidad a partir de estas correlaciones entre los datos de detección de patógenos, y tener en cuenta que otros factores podrían influir en la determinación de los niveles de infección como de co-infecciones presentes en una determinada región. La complejidad de las interacciones de los factores que limitan la salud de la abeja requiere trabajos futuros que esclarezcan los efectos de la presión simultánea de múltiples estresores, con la finalidad de poder estimar con precisión sus efectos interactivos (Bruckner *et al.*, 2021).

4.2. Relación entre origen genético de las abejas y presencia de patógenos

La presencia de abejas descendientes de *A. m. scutellata* parece ser un factor crucial que afecta la supervivencia de las abejas melíferas (Martin & Medina, 2004; Medina-Flores *et al.*, 2014; Hamiduzzaman *et al.*, 2015; Ramos-Cuellar *et al.*, 2022). Apicultores e investigadores han descubierto que estas abejas son más resistentes a ciertos patógenos y parásitos que las abejas europeas (Maggi *et al.*, 2016). Aunque se han reportado diferentes niveles de resistencia entre las abejas africanizadas (Mendoza *et al.*, 2014).

La capacidad reproductiva de *V. destructor* ha sido estudiada en numerosas ocasiones y en regiones tropicales de América ha mostrado diferentes niveles de impacto dependiendo de factores extrínsecos como variaciones geográficas, condiciones climáticas y, en particular, la presencia de colonias de abejas africanizadas (Rosenkranz 1999; Carneiro *et al.* 2007), que producen generaciones a un ritmo más rápido que las poblaciones de abejas melíferas europeas, lo que también favorecería una tasa más rápida de selección de rasgos beneficiosos en ambientes tropicales (Ramos-Cuellar *et al.*, 2022). Reportes previos de prevalencia de *Varroa* en Chile, Uruguay y Argentina indicaron una prevalencia de más del 70% (Maggi *et al.*, 2016) con mayores pérdidas en híbridos de linajes europeos (Fuentes *et al.*, 2022). Por otro lado, las abejas de Venezuela, Brasil y algunas regiones de Uruguay y Argentina, son capaces de coexistir con *V. destructor* (Maggi

et al., 2016). Los híbridos africanizados extendidos en el continente, y que se encuentran en la mayor parte de Uruguay y en las partes más septentrionales de Argentina (Branchiccela *et al.*, 2014; Genchi García *et al.*, 2018; Porrini *et al.*, 2019), presentan altos niveles de resiliencia frente a infestaciones por *V. destructor* (Rosenkranz, 1999; Mendoza *et al.*, 2020). Las colonias de mitotipo y morfotipo africano presentan niveles significativamente más bajos de parasitismo que las colonias de mitotipo y morfotipo europeos y a mayor grado de africanización, las colonias presentan menor infestación por *V. destructor* (Moretto *et al.*, 1991; Guzman-Novoa *et al.*, 1996, 1999; Rosenkranz, 1999; Martin & Medina, 2004; Mondragón *et al.*, 2005, 2006). Guzman-Novoa *et al.* (1996, 1999) propusieron que las crías de cepas europeas son dos veces más atractivas para los ácaros que las de *A. m. scutellata*. Medina-Flores *et al.* (2014) también encontraron que las colonias de genotipo africano tuvieron tasas de infestación por *V. destructor* más bajas en comparación con las colonias de genotipo europeo en el norte de México. En Colombia, donde un alto porcentaje de las colonias de abejas melíferas tienen mitotipo africano, Tibatá *et al.* (2021) reportaron bajos niveles de infestación por *Varroa*, sugiriendo una relación negativa entre la herencia africana y las tasas de infestación por ácaros. Y en Nicaragua, la infestación por *Varroa* mostró niveles bajos en las colmenas africanizadas (Düttmann *et al.*, 2021). Para Ramos-Cuellar *et al.* (2022), la ascendencia africana y europea de las abejas, influye en la resistencia a DWV, BQCV y *Varroa*, siendo las primeras las que presentan mayor resistencia. Sin embargo, no hallaron diferencias en la prevalencia de ácaros cuando se analizó la ascendencia de las colonias por mitotipo, lo que podría sugerir que la herencia materna de las colonias no es muy relevante para la probabilidad de detección del parásito (Ramos-Cuellar *et al.*, 2022). Por otra parte, apicultores e investigadores de campo han informado un aumento de la infestación de ácaros y de las infecciones por virus en las abejas melíferas africanizadas (Pinto *et al.*, 2022).

Las 10 categorías de infestación analizadas en los capítulos 2 y 3, para *V. destructor*, se registraron tanto en las poblaciones de origen europeo como africano. Mientras que el mayor porcentaje de muestras que presentaron algún grado de infestación por *Varroa* pertenece al linaje materno europeo, la mayor pertenencia a los haplogrupos mitocondriales africanos, se observó en las muestras de la categoría de infestación 10-15%. Sin embargo, la evaluación de la asociación entre *V. destructor* y los linajes maternos analizada con la prueba de Fisher en este capítulo mostró independencia entre las variables. Esto puede deberse a que, aunque la asociación parásito-huésped solo existe desde hace 2 décadas, probablemente se ha desarrollado un mecanismo de tolerancia para mantener las colonias de abejas en coexistencia con el ácaro (Düttmann *et al.*, 2021). Esto se ha demostrado con el huésped original de *Varroa spp.*, la abeja melífera oriental *Apis cerana*, y aunque hay pocos casos de poblaciones naturalmente resistentes a *Varroa* en la subespecie de *A. mellifera* (Le Conte *et al.*, 2020), algunas poblaciones de origen europeo se han adaptado al ácaro, a través de la selección natural o la cría selectiva (Seeley, 2006; Le Conte *et al.*, 2007; Büchler *et al.*, 2010; Rinderer *et al.*, 2010; Locke, 2016). Estas ‘poblaciones sobrevivientes’ logran mantener los niveles y daños de los parásitos por debajo de umbrales críticos mediante la expresión de una diversidad de rasgos de resistencia o tolerancia a los parásitos

(Kurze *et al.*, 2016; Mondet *et al.*, 2020). Dicha resistencia a las infestaciones de *V. destructor* también se observa en la subespecie de *A. mellifera* nativa de la región subsahariana de África (Strauss *et al.*, 2015; Pirk *et al.*, 2016; Nganso *et al.*, 2017), así como algunas poblaciones de origen africano (Camazine, 1986; Guzmán-Novoa & Sánchez, 1996; Medina-Flores *et al.*, 2014), como la abeja africanizada que presenta un alto grado de resistencia (Le Conte *et al.*, 2020).

Adicionalmente, el crecimiento de la población de *V. destructor* en las colonias es un rasgo seleccionable y hereditario (Lodesani *et al.*, 2002; Maucourt *et al.*, 2020; De la Mora *et al.*, 2020). Los tratamientos utilizados para controlar la infestación también remueven las presiones selectivas de la infestación natural, previniendo procesos co-evolutivos que lleven a una relación hospedador-parásito estable (Neumann & Blacqui re, 2016). Por ello, es posible que la selección natural haya favorecido la evolución de estos rasgos en mayor medida en las poblaciones de abejas africanizadas respecto de las europeas, particularmente porque las colonias de abejas africanizadas no han sido sometidas a tratamientos químicos contra el ácaro con la intensidad en que se utilizan en las colonias de abejas europeas (Ramos-Cuellar *et al.*, 2022), sumado a que esta tendencia comienza a revertirse a partir del registro de poblaciones de ácaros con desarrollo de resistencia a acaricidas (González-Cabrera *et al.*, 2013, 2016; Locke, 2016; Mitton *et al.*, 2018). Por otra parte, debido a su sistema de apareamiento y a su propagación mundial a partir de un número restringido de poblaciones fuente, inicialmente se sugirió que las poblaciones de *V. destructor* estaban compuestas por individuos pseudoclonales (Solignac *et al.*, 2005). Sin embargo, varios estudios recientes han demostrado que las poblaciones de *V. destructor* muestran niveles significativos de diversificación genética a diferentes escalas geográficas (Dynes *et al.*, 2017; Beaurepaire *et al.*, 2019; Moro *et al.*, 2021a; Beaurepaire *et al.*, 2022), con diferentes niveles de virulencia (Navajas *et al.*, 2002; Solignac *et al.*, 2003; Beaurepaire *et al.*, 2019).

La supresión del éxito reproductivo del ácaro en las celdas de cría es otro mecanismo que se considera crucial en la resistencia adaptativa (Mondragón *et al.*, 2006) y se traduce en baja fertilidad, fecundidad y éxito reproductivo de los ácaros, explicando la resistencia de las abejas en varias poblaciones, como *A. m. scutellata* (Strauss *et al.*, 2016), abejas africanizadas (Giacobino *et al.*, 2014) y poblaciones de abejas de origen europeo (Rinderer *et al.*, 2001; Locke *et al.*, 2012; Moro *et al.*, 2021a). Además, se pueden medir otros parámetros asociados con la resistencia a *V. destructor* en los dos genotipos, como la infestación de cría frente a la de abejas adultas (Russo *et al.*, 2020b; Maucourt *et al.*, 2020; Büchler *et al.*, 2020).

Otro resultado de este estudio fue la relación positiva y significativa encontrada entre las tasas de infestación por *V. destructor* y los niveles de virus, lo que indica que el ácaro juega un papel importante como vector y transmisor del virus, como se ha documentado en abejas melíferas europeas (Gisder *et al.*, 2009; Emsen *et al.*, 2015; Di Prisco *et al.*, 2016; Anguiano-Báez *et al.*, 2016; Reyes-Quintana *et al.*, 2019).

Adicionalmente, existe una gran probabilidad de que las abejas melíferas africanizadas se encuentren en todos los colmenares, debido a la ventaja de apareamiento de los zánganos africanizados (Rinderer *et al.*, 1985) y el

período más corto de eclosión de huevos de las reinas de las abejas melíferas africanizadas (Harbo *et al.*, 1981), lo que contribuiría a la resistencia de las abejas híbridas independientemente de su origen materno.

El análisis de la detección de virus los ubicó tanto en poblaciones de abejas de origen europeo como africano, a excepción de CBPV que solo estuvo presente en poblaciones de origen europeo. Las muestras pertenecientes al linaje materno africano presentaron mayor frecuencia de co-infecciones respecto de las infecciones simples, y las de linaje europeo mayor frecuencia de infecciones simples en el análisis total. Sin embargo, la evaluación de la asociación entre virus y la pertenencia a un origen materno determinado no mostró diferencias en la prevalencia viral entre las colonias de ascendencia africana y europea. En contraste, Hamiduzamann *et al.* (2015) hallaron que las abejas melíferas africanizadas y europeas diferían en su resistencia a varios virus, al igual que Mendoza *et al.* (2020) y Ramos-Cuellar *et al.* (2022) que también reportaron que las colonias con un bajo grado de africanización mostraron mayores niveles de infección por DWV en comparación con las colonias con un alto grado de africanización. Sin embargo, múltiples infecciones virales se encuentran ampliamente distribuidas y en alta prevalencia en poblaciones de abejas africanizadas en Brasil (Guimaraes-Cestaro *et al.*, 2024; Mascena Peixoto *et al.*, 2024), en Costa Rica, en donde la prevalencia ha aumentado a lo largo de los años (Chaves Guevara *et al.*, 2024), y en Uruguay (Mendoza *et al.*, 2014), aunque en este último caso las colonias de abejas africanizadas tenían niveles más bajos de infección respecto de las italianas.

Si bien los resultados no son coincidentes con otros expuestos para la región, que sugieren una mayor resistencia de las abejas melíferas africanizadas frente a ciertos virus, las prevalencias y cargas virales en abejas africanizadas se encuentran en aumento en los últimos años (Chaves Guevara *et al.*, 2024). Por otra parte, los análisis presentados en este capítulo fueron realizados sobre las detecciones y no sobre las cuantificaciones de los virus, por lo que no es posible inferir capacidad de tolerancia a partir de estos datos y otros análisis son necesarios para poder realizar esa evaluación.

Lewkowski & Erler (2019) expusieron que la diversidad en los resultados a nivel de colonia en infecciones de EFB probablemente se debe a una variedad de factores que incluyen antecedentes genéticos del huésped. Sin embargo, las frecuencias de detección de *M. plutonius* registradas en este capítulo son similares para ambos linajes, y la evaluación de la asociación entre patógenos y linajes maternos mostró independencia entre el origen y la detección de *M. plutonius*, indicando que el linaje materno podría no tener influencia en la resistencia a este patógeno. Otros autores proponen que tanto el comportamiento del huésped como factores ambientales, presencia de co-infecciones y el grado de virulencia de las cepas tendrían un papel predominante en el desarrollo de EFB (Milbrath *et al.*, 2021).

La evaluación de la asociación entre *Vairimorpha* spp. y los linajes maternos de las poblaciones analizadas, mostró independencia de las variables. Sin embargo, De la Mora *et al.* (2023) reportaron que la infección por

V. ceranae no tuvo un efecto significativo en la supervivencia de abejas africanizadas, mientras que Guimaraes-Cestaro *et al.* (2024) hallaron que *V. ceranae* fue el microsporidio que mayor intensidad de infección presentó durante el verano y otoño en poblaciones de abejas híbridas de origen africano.

Curiosamente, las mayores frecuencias registradas de *Vairimorpha* spp. para los haplogrupos de linaje materno europeo pertenecieron al nivel DESPRECIABE, mientras que para las muestras de origen materno africano pertenecieron al nivel GRAVE. Estos resultados podrían indicar una diferencia de tolerancia entre los linajes que no fue evidenciada en el *test* de Fisher que utilizó como variable solamente la detección de esporas sin discriminar los niveles de abundancia media. Huang *et al.* (2012) reportaron que existe una mayor supervivencia y mayor respuesta inmune en abejas tolerantes en comparación con las abejas sensibles. De igual modo, el clima, la temperatura y el intercambio de colmenas, y los materiales contaminados también podrían influir en la prevalencia e infección de *Vairimorpha* spp. (Chen *et al.*, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2009; Gisder *et al.*, 2010; Blot *et al.*, 2023).

Los capítulos 2 y 3 proporcionan una actualización exhaustiva sobre la diversidad documentada de los patógenos de las abejas y su distribución geográfica, y señalan la necesidad de obtener más información sobre las limitaciones de la salud de las abejas melíferas. Aunque las causas de la disminución de polinizadores son complejas y no existe consenso sobre ellas, las soluciones deben tender a la toma de medidas que contribuyan a reducir o eliminar cualquier factor de *stress* (Goulson *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta que los genes inmunitarios pueden estar regulados al alza en respuesta a una infección (Doublet *et al.*, 2017), un patógeno puede debilitar la inmunidad (Di Prisco *et al.*, 2016) creando una correlación negativa, o el nivel de un patógeno podría aumentar en respuesta a un sistema inmunitario que está regulado a la baja debido a otros factores (Dolezal & Toth, 2018), no es posible inferir causalidad a partir de correlaciones entre los datos de expresión génica y de patógenos. La manera más acertada de preservar las poblaciones de abejas en Sudamérica parece ser mediante la comprensión de la biología de las abejas y la biología de las plagas para cada región. Las poblaciones de abejas con alta tasa de comportamiento higiénico tienen más probabilidades de sobrevivir (Maggi *et al.*, 2016) y presentan una sensibilidad olfativa superior (Masterman *et al.*, 2001; Swanson *et al.*, 2009; Guarna *et al.*, 2015; Mondet *et al.*, 2015, 2020).

Se ha demostrado que la cría selectiva puede aumentar tanto la intensidad como la proporción del comportamiento higiénico, y que la selección de este rasgo puede ser una medida eficaz para mejorar la resistencia de *A. mellifera* contra *Varroa*, AFB, EFB y cría yesificada (Spivak & Reuter, 1998; Palacio *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2007; Büchler *et al.*, 2010; Rinderer *et al.*, 2010; Bigio *et al.*, 2014). El desarrollo de resistencia genética también puede resultar de la implementación exitosa de programas de reproducción que utilicen caracteres adecuados (Le Conte *et al.*, 2020).

Se encuentran en desarrollo nuevas herramientas, como los ensayos de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfismo de un solo nucleótido) para mejorar la comprensión de la diversidad de genes de inmunidad

(Henriques *et al.*, 2021a). Por otra parte, la ubicación geográfica influye en la prevalencia de enfermedades, siendo el componente ambiental el único factor significativo o, si está presente un componente genotípico, la influencia ambiental es más fuerte (Meixner *et al.*, 2014). Las condiciones ambientales y las prácticas apícolas también pueden contribuir activamente a la supervivencia de las abejas (Mondet *et al.*, 2020). Por lo tanto, el estrés migratorio experimentado en la edad adulta puede desencadenar cambios fisiológicos, como una menor expresión de algunos genes inmunes y de resistencia al estrés que permitieron infecciones exitosas (Simone-Finstrom *et al.*, 2021). Esto sugiere que otros factores podrían influir en la determinación de los niveles de infección y destaca la necesidad de realizar más estudios para identificar la fuente de esta variación (Castelli *et al.*, 2021).

Por otra parte, la selección artificial mediante la inseminación con un solo zángano, como la iniciada por Harbo & Hoopingarner (1997) y Harbo & Harris (1999), puede utilizarse para aumentar la frecuencia de los alelos de resistencia en grandes poblaciones de abejas melíferas (van Alphen *et al.*, 2020).

Adicionalmente, la determinación de la ascendencia genómica en poblaciones locales y los genes que contienen son fundamentales para comprender los cambios genéticos que subyacen al éxito ecológico de las abejas melíferas africanizadas y podrían arrojar luz sobre la ubicación y el origen de las regiones útiles para la cría de abejas más resistentes a los factores que actualmente perjudican a las poblaciones y a la industria apícola (Zárate *et al.*, 2022).

Si bien los programas de cría selectiva dirigidos a alcanzar el equilibrio entre los genotipos europeos y africanos podrían ser quizás el mejor compromiso para mantener las colonias de abejas melíferas sanas y fuertes en el continente americano, en beneficio de la industria apícola (Ramos-Cuellar *et al.*, 2022), es necesario analizar e incluir otros factores determinantes en la salud de las colonias como la alimentación, el clima, la regionalización geográfica y los eventos de trashumancia. Esto podría contribuir a garantizar una apicultura más sostenible, además de proporcionar nuevos conocimientos sobre las interacciones huésped-patógeno, las diferentes interacciones co-evolutivas, y la importancia de la diversidad genética en la epidemiología de las enfermedades.

CAPÍTULO 4

Análisis de la mortalidad de abejas adultas expuestas a agroquímicos a partir de ensayos de toxicidad oral aguda *in vitro*.

Diferencias entre mitotipo europeo y africano.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Productos químicos sintéticos de uso en producción agrícola. Agroquímicos

Desde el final de la Segunda Guerra Mundial, la producción y el uso de agroquímicos se ha generalizado a nivel mundial, volviéndose cada vez más intensivo (Stephenson, 2003). Al facilitar la agricultura a gran escala reduciendo los impactos de los parásitos y patógenos de los cultivos, han permitido aumentar la productividad (Coulon, 2017).

El avance de la frontera agrícola en las últimas décadas, junto a la implementación generalizada de cultivos transgénicos, las prácticas agrícolas intensivas, los cambios en el uso de la tierra, y la expansión de las áreas de monocultivos, ocasionaron profundas transformaciones en la configuración regional (Greene *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2012; Lechenet *et al.*, 2017; Campana *et al.*, 2019). En adición, la explosión demográfica, la creciente demanda de alimentos, la tecnificación agrícola y la necesidad de controlar tanto la incidencia de nuevas y diversas plagas (Lu *et al.*, 2008), como el desarrollo de resistencia (Zhu *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2012), condujeron a la intensificación en la utilización de plaguicidas cada vez más específicos, con un potencial impacto negativo (tanto directo como indirecto) para las poblaciones de polinizadores y su consecuente costo económico en los sistemas agrícolas.

Los esfuerzos de desarrollo tecnológico han propiciado la introducción de productos químicos sintéticos para la protección de cultivos, que permiten un mayor aumento en la producción de alimentos. Cuando un plaguicida es aplicado a un cultivo agrícola, aproximadamente el 1% del compuesto alcanza al organismo blanco (Pimentel, 2002) mientras que el 99% restante es retenido en el follaje o se dispersa en el ambiente por volatilización, escorrentía y lixiviación (Wasim *et al.*, 2009). De este modo, su uso acaba generando residuos no solo en néctar y polen (Barascou *et al.*, 2021), sino también en el suelo, aire, agua, y en productos como la miel, jalea real, cera o el propóleo (Figura 4.1). Por lo tanto, además de configurar un potencial peligro para la salud de las abejas y otros polinizadores, ponen en riesgo el valor comercial de los productos apícolas (Simon-Delso *et al.*, 2022).

Actualmente, existen gran variedad de agroquímicos disponibles para el control de plagas de cultivos, entre los que los herbicidas, fungicidas e insecticidas representan más del 95% del mercado mundial (FAOSTAT, 2021), e incluyen organofosforados y neonicotinoides (García *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2017a, 2017b).

1.2. La incidencia de los plaguicidas en el entorno apícola y en la salud de las abejas

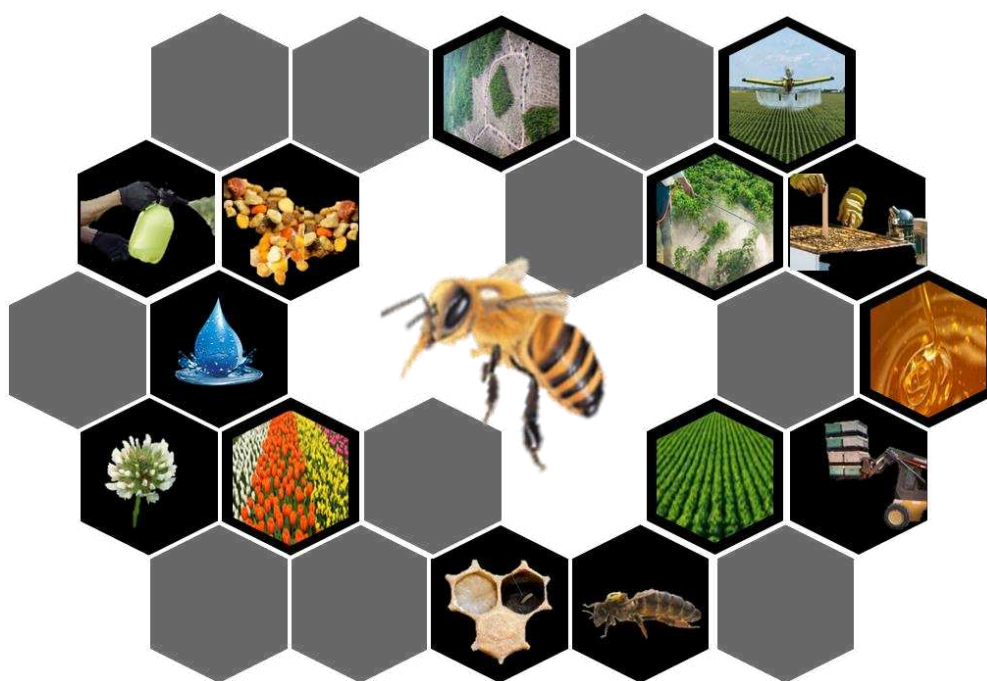
Las abejas cumplen un importante rol como polinizadores de cultivos esenciales para la seguridad alimentaria del planeta junto a otros servicios ecológicos (Klein *et al.* 2007; Gallai *et al.* 2009; Goulson, 2015; Potts *et al.* 2016; Espregueira Themudo, 2020), sin embargo se encuentran sujetas a múltiples presiones ambientales (Goulson *et al.*, 2015; Hassler *et al.*, 2021). Entre ellas, las prácticas agrícolas convencionales basadas en el uso de agroquímicos, la fragmentación de hábitats, la pérdida de recursos de forrajeo, y la disminución de plantas con flor (Turnbull, 2010; vanEngelsdorp, 2013; Mondet *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015; Goulson *et al.*, 2015;

Çakmak & Sevençakmak, 2016; Forfert *et al.*, 2017; Brandt, 2017; Lechenet *et al.*, 2017; Steinhauer *et al.*, 2018; Bartomeus *et al.*, 2019; Hristov *et al.*, 2020; Milone & Tarpay 2021; de Jongh *et al.*, 2022; Mayak *et al.*, 2022), afectan los ecosistemas y han sido resaltadas como posibles estresores que conducen al colapso de colonias (Desneux *et al.*, 2007; Maini *et al.*, 2010). Los recientes registros de disminución de las poblaciones revisten una creciente preocupación en el sector productivo, ya que supone una seria amenaza para una gran variedad de cultivos (Osman *et al.*, 2020).

Particularmente, las flores representan un gran riesgo para las abejas por la posibilidad de transporte de agroquímicos, o metabolitos derivados de ellos (Rainey *et al.*, 1978; Loader & Anderson, 1981; Dooley *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Ohno *et al.*, 2010; Hitomi *et al.*, 2013; Wanzala & Ogoma, 2013; Peterson *et al.*, 2022), dado que son necesarias para la alimentación de la colonia y la producción apícola. En los paisajes agrícolas modernos suelen existir exposiciones a diversas clases de agroquímicos (Mullin *et al.*, 2010; Lundin *et al.*, 2015; Schmuck & Lewis, 2016), creando oportunidades para múltiples efectos combinados que pueden generar diversos tipos de intoxicación (Desneux *et al.*, 2007; Maini *et al.*, 2010; Broadrup *et al.*, 2019; Tosi *et al.*, 2022). Los efectos letales que producen estos compuestos son de fácil observación, sin embargo, en dosis muy bajas pueden inducir efectos sub-letales que pueden afectar la locomoción, la capacidad de vuelo, el comportamiento, la orientación, la capacidad de aprendizaje, la memoria, la respuesta a estímulos, la crianza y cuidado de la reina, el desarrollo de glándulas y órganos, la fisiología y el metabolismo, el ritmo cardíaco, la frecuencia respiratoria, la termorregulación o la capacidad reproductiva en reinas y zánganos (Pisa *et al.*, 2015; Abdelkader *et al.*, 2021), que a largo plazo pueden provocar la muerte de una colonia. El efecto producido dependerá del nivel de exposición, de su afinidad con los receptores de la célula y de la capacidad de desintoxicación del individuo (Simon-Delso *et al.*, 2022). El impacto de los plaguicidas, específicamente los neonicotinoides, en la inmunidad y la salud de las abejas melíferas es uno de los efectos sub-letales a los que se le ha dedicado especial atención (James & Xu, 2012; Di Prisco *et al.*, 2013).

Múltiples estresores pueden interactuar tanto de manera aditiva como antagónica (Côté *et al.*, 2016; Straub *et al.*, 2020; Bird *et al.*, 2021; Siviter *et al.*, 2021) generando efectos sobre las abejas individuales y las colonias. Los mecanismos responsables de cada tipo de interacción varían, pero pueden estar influenciados por la competencia por recursos limitados (Poulin, 2007) o el estrés del huésped como resultado de la supresión inmune (Alaux *et al.*, 2010b; Pettis *et al.*, 2013). En los insectos sociales el control inmunológico es de importancia central (Cremer *et al.*, 2007; Evans & Spivak, 2010), ya que su estabilidad depende de mecanismos sofisticados y finamente sintonizados, basados en la diversidad y la tolerancia. Específicamente, los plaguicidas como algunos neonicotinoides y el glifosato han mostrado interacciones sinérgicas con parásitos y patógenos con efectos aditivos negativos para las abejas (Claudianos *et al.*, 2006; Nazzi *et al.*, 2012; Prisco *et al.*, 2013; Nazzi & Pennacchio, 2014, 2018; Brandt *et al.*, 2016; Straub *et al.*, 2016; Coulon, 2017; Ciereszko *et al.*, 2017; Heard *et al.*, 2017; Rortais *et al.*, 2017; Siede *et al.*, 2018; Annoscia *et al.*, 2019; Broadrup *et al.*, 2019; Tesnovik *et al.*, 2019, 2020; Coulon *et al.*, 2020; Morfin *et al.*, 2020; Bruckner *et al.*, 2021; Castelli *et al.*, 2021;

El agua es particularmente importante, ya que, a través de ella, cultivos no objetivo o plantas no cultivadas, como malezas o plantas silvestres, pueden ser contaminados con agroquímicos (Long & Krupke, 2016) y, por lo tanto, volver a estar disponible para las abejas (Krupke *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2015). Cuando el agua y los alimentos, sumados a la miel, cera y propóleo están contaminados pueden ser una fuente de exposición crónica. Los agroquímicos también pueden permanecer en el ambiente prolongando el tiempo y posibilidades de exposición (Simon-Delso *et al.*, 2022)(Figura 4.1).



Lic. Genchi García, ML
Trabajo de Tesis Doctoral – CAP. 4

Argentina es el país con mayor número de colmenas en el hemisferio sur y la producción apícola presenta gran dispersión geográfica con una marcada tendencia a la trashumancia hacia zonas con mayor oferta floral (Campana *et al.*, 2019; Submitter *et al.*, 2020). Si bien su mayor concentración se da en la región CENTRO; NOA, el monte pampeano-puntano entre las regiones CENTRO y CUYO, la zona frutícola perteneciente a PATAGONIA y los corredores de los ríos Paraná, Uruguay y de La Plata, albergan colmenas provenientes de otras zonas del país (Campana *et al.*, 2019). En este escenario productivo, nuestro país ha empleado 241.519Tn de plaguicidas en 2021 (FAOSTAT, 2021), en aplicaciones totales referidas a la utilización agroindustrial, con potenciales efectos en producciones no agrícolas, como la pecuaria, la pesquera, y principalmente, la apícola.

El equilibrio de comunidades ecológicas complejas está expuesto a una gran cantidad de riesgos generados por los efectos impredecibles de diferentes agentes de estrés ambiental que pueden alterar el equilibrio inmunológico y el flujo de energía a través del sistema (Annoscia *et al.*, 2019). Los plaguicidas desempeñan un papel importante en las altas tasas de pérdida de insectos que se observan globalmente, afectando de manera directa al ecosistema, a los productores y a la agricultura. Esta tendencia genera inquietudes sobre la capacidad a futuro de la entomofauna para brindar los servicios regulatorios del ecosistema, de aprovisionamiento, o culturales en los que participan como la polinización, regulación de plagas, reciclaje de nutrientes, y producción de alimentos, fibras, bioquímicos y medicinas naturales (Simon-Delso *et al.*, 2022). Si bien las abejas melíferas no son organismo objetivo de la mayoría de los plaguicidas, están expuestas a ellos (Battaglin *et al.*, 2014; Rubio *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2017; Berg *et al.*, 2018). En este sentido, las evaluaciones del riesgo de los agroquímicos tienen el potencial de mejorar el conocimiento sobre los efectos en las abejas y otros organismos participantes del ecosistema.

Teniendo en cuenta que existen numerosos trabajos que analizan las diferencias en resistencia y tolerancia a enfermedades entre distintos linajes y ecotipos (Fries *et al.*, 2006; Locke *et al.*, 2011; Bak & Wilde, 2015; Locke, 2016; Leclercq *et al.*, 2017; Nganso *et al.*, 2017; Martin-Hernandez *et al.*, 2018; Traynor *et al.*, 2020; Pusceddu *et al.*, 2021; Peck, 2021); que el nivel y las vías de exposición dependen fuertemente de la etapa de desarrollo, la edad y la especie de abejas, así como del perfil físico-químico y la forma de aplicación del pesticida, y que la expresión de la toxicidad frente a una sustancia y la posibilidad de detoxificación (Leska *et al.*, 2022) guardan relación con mecanismos del organismo afectado regulados genéticamente, el siguiente capítulo expondrá los análisis de la respuesta de dos linajes maternos de *A. mellifera* frente a ensayos de toxicidad oral aguda realizados con pesticidas de distinta naturaleza.

1.3. Naturaleza química y efectos de los agroquímicos utilizados

1.3.1. Neonicotinoides (Thiamethoxam e Imidacloprid)

Los neonicotinoides son insecticidas derivados de la nicotina. Estos compuestos actúan sobre el sistema nervioso central interfiriendo en la transmisión de estímulos al bloquear de manera irreversible los receptores post-sinápticos nicotínicos de la acetilcolina, compitiendo con el neurotransmisor natural y produciendo una

sobre estimulación de las sinapsis colinérgicas resultando en hiperexcitación, convulsiones, parálisis y muerte del insecto (Nauen *et al.*, 2003). Estos compuestos se emplean foliarmente, en el recubrimiento de semillas o mediante aplicación de drenaje de raíces (Bonmatin *et al.*, 2007; Botías *et al.*, 2015; Brandon & Robinson, 2015; Catchot *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2020). Su estructura química les confiere propiedades sistémicas que permiten una protección total de la planta y pueden traslocarse al polen y néctar a través del xilema en las plantas en crecimiento, que disminuyen su concentración a medida que el vegetal crece (Sánchez-Bayo *et al.*, 2016), pero pueden ser letales para las abejas (Henry *et al.*, 2012; Azpiazu *et al.*, 2019; Gierer, *et al.*, 2019), o inducir efectos sub-letales (Decourtye *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2012; Larson *et al.*, 2013; Sánchez Bayo *et al.*, 2016; Démares *et al.*, 2022). Dentro del rango de efectos registrados por intoxicación con neonicotinoides, se destacan la afección en la longevidad, comportamiento de búsqueda de alimento, alimentación, aprendizaje y memoria (Decourtye *et al.*, 2004; Cresswell *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012).

El contacto con estas sustancias puede darse durante el libado y almacenamiento de alimento en las colonias para su posterior consumo (Botías *et al.*, 2015; Krupke *et al.*, 2016), o por suelo contaminado y polvo liberado durante las tareas de siembra de las semillas tratadas (Krupke *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2015). Se han detectado neonicotinoides en el polen recolectado por las abejas de múltiples fuentes (Stoner & Eitzer, 2012; Pilling *et al.*, 2013; Botías *et al.*, 2015; Wood *et al.*, 2019), así como en el pan de abeja (polen procesado almacenado dentro de la colonia)(Bonmatin *et al.*, 2015; Mogren & Lundgren, 2016; Tong *et al.*, 2018)(Figura 4.1). Además, estos compuestos se liberan fácilmente al suelo y al agua, donde pueden persistir y trasladarse a la vegetación adyacente, lo que representa un riesgo para organismos no objetivo (Sur *et al.*, 2003; Bonmatin *et al.*, 2015). El riesgo de exposición aumenta cuando las recolectoras individuales llevan a la colonia recursos contaminados que se comparten con otros adultos e inmaduros en desarrollo (Sanchez-Bayo & Goka, 2014).

Los neonicotinoides se encuentran entre los insecticidas más ampliamente aplicados a nivel mundial (Zhu *et al.*, 2004; Jeschke *et al.*, 2011; Simon-Delso *et al.*, 2015; van der Sluijs *et al.*, 2015), y sus efectos en el medio ambiente fueron ampliamente relacionado con la pérdida de colonias (Maini & Aggarwal, 2010; Cresswell *et al.*, 2012; Farooqui, 2013; Goulson *et al.*, 2015). De manera individual pueden presentar una serie de consecuencias negativas que pueden ir desde efectos sub-letales fisiológicos, anatómicos y comportamentales hasta una reducción en la supervivencia, seguido de la muerte (Straub *et al.*, 2016; Havard *et al.*, 2020; Friedli *et al.*, 2020; Singla *et al.*, 2021). A su vez, el efecto que producen en las abejas podría ser aditivo en combinación con otras clases de pesticidas (Gill *et al.*, 2012; Biddinger *et al.*, 2013; Godfray *et al.*, 2014).

Al presentar un efecto sistémico son un importante factor abiótico de riesgo para las colonias (Simon-Delso *et al.*, 2015; Wood & Goulson, 2017), afectando negativamente el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y, por tanto, la actividad de cuidado y alimentación de la cría (Hatjina *et al.*, 2013; Minnameyer *et al.*, 2021). Adicionalmente, influyen en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Derecka *et al.*, 2013; Cook, 2019), aunque bajas concentraciones pueden resultar en un aumento de la masa corporal, posiblemente a expensas del *fitness* (Cutler, 2012; Cutler & Rix, 2015).

Particularmente, las exposiciones orales a los neonicotinoides podrían encontrarse dentro de las más preocupantes debido a la mayor toxicidad relativa (dosis letal media baja) y a una mayor probabilidad de exposición a residuos en polen, néctar y agua (Alkassab *et al.*, 2017). Se les atribuye gran responsabilidad en la alta mortalidad de las abejas y las afecciones por efectos sub-letales tanto en ensayos de laboratorio como a campo, y solos o en presencia de otros factores estresantes (Alaux *et al.*, 2010a; Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2012; Nazzi & Pennacchio, 2014; Doublet *et al.*, 2015a; Tison *et al.*, 2016; Dussaubat *et al.*, 2016), ya que la planta sólo utilizará parte de la sustancia activa (van der Sluijs *et al.*, 2015) y el resto se encontrará en el medio ambiente. Por otra parte, al ser fácilmente solubles en agua, pueden contaminar el suelo por lixiviación, esparcirse por el área tratada y contaminar las aguas superficiales y subterráneas (Gupta *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2011; van der Sluijs *et al.*, 2015).

Además, tanto los neonicotinoides como sus metabolitos son muy persistentes en suelo, sedimentos y agua (van der Sluijs *et al.*, 2015) con un alto riesgo de acumulación (Haith, 2010).

El impacto de los neonicotinoides en condiciones de campo aún no se ha dilucidado por completo, aunque se han desarrollado numerosos estudios presentando resultados contradictorios en cuanto a los efectos tóxicos sobre los polinizadores, si bien es bastante habitual encontrar efectos negativos en las abejas en ensayos de laboratorio y de semi-campo (Johnson *et al.*, 2010; Cresswell *et al.*, 2012; Carreck & Ratnieks, 2014; Sánchez-Bayo, 2014; Sandrock *et al.*, 2014; Goulson *et al.*, 2015; Lundin *et al.*, 2015; Straub *et al.*, 2016; Blacquiere & Van der Steen, 2017; Carreck, 2017; Ciereszko *et al.*, 2017; Woodcock *et al.*, 2017; Odemer *et al.*, 2018).

Entre los neonicotinoides, se encuentra el grupo de las nitroguanidinas que presentan un grupo nitro-(NO₂) e incluyen a pesticidas como imidacloprid y thiamethoxam.

El imidacloprid [IUPAC: (E)-1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamina] (Figura 4.2) es una sustancia con actividad insecticida, que puede ser aplicado tanto vía foliar como radicular a través del agua de riego. Tiene un efecto residual prolongado en el suelo y se encuentra etiquetado como utilizable para el control de plagas y tratamiento de semillas (Jiang *et al.*, 2018). Numerosos residuos y metabolitos secundarios han sido hallados en muestras de polen (Henry *et al.*, 2012).

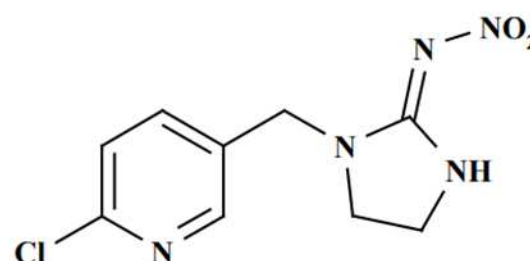


Figura 4.2 – Fórmula estructural del compuesto imidacloprid. Tomado de: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Imidacloprid_2013.pdf

Por su parte, el thiamethoxam [IUPAC: (EZ)-3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-iliden(nitro)amina] (Figura 4.3) es uno de los neonicotinoides más utilizados en el mundo, para fumigación de cultivos y recubrimiento sistémico de semillas de maíz y colza (Maienfisch *et al.*, 2001; Nauen *et al.*, 2003; van der Sluijs *et al.*, 2015). Presenta actividad translaminar y alta sistemicidad en forma ascendente, con una excelente translocación en el xilema, y además, una pequeña cantidad de producto es transportado a través del floema. Es un insecticida que actúa por contacto e ingestión, interfiriendo los receptores nicotínicos post-

sinápticos de acetilcolina, afectando al sistema nervioso central. Estas moléculas tienen la particularidad de poder circular en el sistema vascular de la planta y así migrar a todos los tejidos. Por lo tanto, se pueden encontrar en el néctar o el polen producido por la planta, aunque inicialmente solo la semilla estuviera

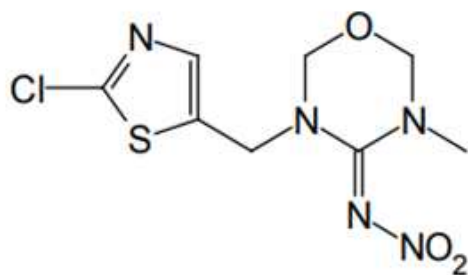


Figura 4.3 – Fórmula estructural del compuesto thiametoxam. Tomado de: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report10/Thiametoxam.pdf

recubierta con el pesticida. Presenta numerosos metabolitos hallados en plantas e insectos (Maienfisch *et al.*, 2001; Nauen *et al.*, 2003; Benzidane *et al.*, 2010; Casida, 2011). Su modo de acción es ligeramente diferente a otros insecticidas de la misma familia y no parece unirse a los mismos receptores (Maienfisch *et al.*, 2001). Algunos análisis han establecido que existen efectos nocivos en las abejas, con dosis letal media a las 48hs estimada en 5ng/abeja (Laurino *et al.*, 2011). Los insectos afectados pueden mostrar inmediatamente síntomas de envenenamiento con hiperexcitación y parálisis, aunque

también se observaron efectos sub-letales en las larvas (Grillone *et al.*, 2017), en los zánganos (Straub *et al.*, 2022) y en las obreras con una reducción significativa de la memoria olfativa, el deterioro del rendimiento del aprendizaje y la inducción del comportamiento de remoción de larvas (Schuehly *et al.*, 2021).

1.3.2. Organofosforados (Clorpirifós)

Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados. Se caracterizan por inhibir enzimas con actividad esterásica, más específicamente de la acetilcolinesterasa, en las terminaciones nerviosas, generando una acumulación de acetilcolina y, como consecuencia, una alteración del funcionamiento del impulso nervioso. Sus efectos varían de acuerdo a la vía de entrada en el organismo (Vale, 1998; Weselak *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2010). Constituyen un grupo de pesticidas muy eficiente y económico (García *et al.*, 2003) y han sido utilizados alrededor del mundo como pesticidas para el manejo de las plagas (Karam *et al.*, 2004). Pese a que permitieron erradicar numerosas plagas en la agricultura, dejaron graves efectos colaterales (Fernández *et al.*, 2010; Espinoza & Bustos-Obregón, 2015), debido a su gran toxicidad, lenta degradación y bioacumulación, lo que ha llevado a una disminución en su uso en los últimos 15 años (Jayaraj *et al.*, 2016; Bird, 2018; Saborio Cervantes *et al.*, 2019).

El Clorpirifós [IUPAC: de 0,0-dietil-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato] (Figura 4.4) es un insecticida organofosforado (Aranzazu *et al.*, 2012; Sánchez, 2012; Calderón, 2017) no sistémico, con acción por contacto, estomacal y respiratorio, de amplio espectro (Akbar & Sultan, 2016; Wang, *et al.*, 2019), utilizado en la agricultura para el manejo de plagas, en cultivos de significancia comercial. Se registró por primera vez en 1965

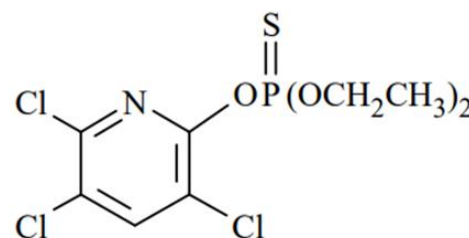


Figura 4.4 – Fórmula estructural del compuesto clorpirifós. Tomado de: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/chlorpyriphos08.pdf

y se ha empleado en grandes cantidades debido a que actúa sobre una gran variedad de insectos (Upegui, 2010; Aguirre-Buitrago *et al.*, 2014). Su aplicación puede realizarse directamente al suelo o por medio de pulverizadores y se registra actualmente en numerosos países, con registros de incidentes por intoxicación (Aucapiña, 2016). Dependiendo del entorno puede ser más, o menos inestable (De la Cruz *et al.*, 2010). La permanencia en el suelo depende de las condiciones ambientales, el tipo de suelo y la concentración (Lopera *et al.*, 2005; Nandhini *et al.*, 2021), y presenta alta bioacumulación (De la Cruz *et al.*, 2010; Agostini, 2013). A pesar de ser considerado moderadamente tóxico, es capaz de causar afecciones graves (Nandhini *et al.*, 2021; Gamboa *et al.*, 2023) y presenta un elevado impacto ambiental con posible contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Cocca *et al.*, 2015). La persistencia de este insecticida representa un peligro para la micro y macrofauna del suelo (Marañón, 2015) y se han encontrado evidencias de la presencia de residuos en la miel (Zhu *et al.*, 2014) y en hojas, tallos, frutos y flores (Ahmad, 2004; Ettiene, 2010; Santoyo, 2014; Guilcamaigua & Chancusig, 2017). Asimismo, se han hallado residuos que propiciaron daños en la nutrición vegetal y la resistencia al ataque de plagas (Mena-Rodríguez *et al.*, 2018)

1.3.3. Herbicidas (Glifosato)

Los herbicidas registrados para el control de malezas también son utilizados en el entorno agrícola, y tienen incidencia en organismos no objetivo, aunque algunos ensayos destacan que resultan menos tóxicos (Mullin, 2010; Heard *et al.*, 2017).

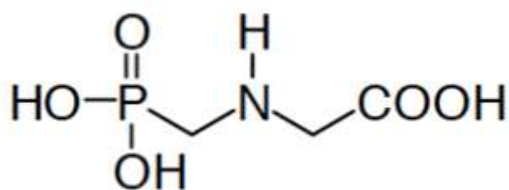


Figura 4.5 – Fórmula estructural del compuesto glifosato. Tomado de: <https://www.fao.org/3/ca9596en/ca9596en.pdf>

El glifosato [IUPAC: N-(fosfonometil)glicina] (Figura 4.5) es el herbicida más utilizado en el mundo (Benbrook *et al.*, 2016; Castelli *et al.*, 2021). Se caracteriza por su no selectividad, por ser de amplio espectro, móvil en el floema y disponible a bajo costo (Duke & Powles, 2008; Benbrook, 2016; Ledoux *et al.*, 2020). Inhibe una enzima que participa en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos secundarios en las plantas, por lo que es ampliamente

utilizado para el control de malezas anuales y perennes (Duke & Powles, 2008; Silva *et al.*, 2018; Grau *et al.*, 2022).

Aunque diferentes estudios han registrado su efecto negativo tanto en las abejas melíferas, como en otros organismos, incluidos efectos perjudiciales sobre el comportamiento, las capacidades cognitivas, sensoriales y de desarrollo (revisado en Farina *et al.*, 2019), su uso todavía está permitido y ha incrementado en gran medida, debido al uso extendido de productos comerciales en cultivos genéticamente modificados resistentes al glifosato (Benbrook *et al.*, 2016), aumentando tanto el rendimiento de los cultivos como el uso de biocidas a base de glifosato en la agricultura, especialmente en Estados Unidos, Brasil y Argentina (Gianessi, 1999; Dill, 2008; Benbrook, 2012, 2016). Este aumento conlleva a la contaminación del suelo, el aire, la lluvia y los cursos de agua, especialmente en las zonas agrícolas (Battaglin *et al.*, 2014; Rubio *et al.*, 2014). Estos herbicidas se

rocían sobre cultivos, son absorbidos por las hojas de las plantas y trasladados a los tejidos en crecimiento (Singh *et al.*, 2020). Al trasladarse a las raíces, se libera al suelo (Laitinen *et al.*, 2007), en donde queda alrededor del 88% del producto rociado (Laitinen *et al.*, 2008, 2009; Lupi *et al.*, 2019). Parte del glifosato ingresa a los cuerpos de agua, después de fuertes lluvias, deshielo, arado o erosión del suelo (Laitinen *et al.*, 2009), y al aire a través de la erosión eólica (Silva *et al.*, 2018).

Existe cada vez más evidencia de sus efectos ecotoxicológicos en la biodiversidad de agroecosistemas no objetivo (Yamada *et al.*, 2009; Cuhra *et al.*, 2016; Kanissery *et al.*, 2019; Zioga *et al.*, 2022) y ha demostrado interferir en procesos biológicos de hongos, bacterias, arañas, insectos y otros artrópodos, microorganismos del suelo, vertebrados y plantas no objetivo (Edwards *et al.*, 1980; Haughton *et al.*, 2001; Nosanchuk *et al.*, 2001; Laitinen *et al.*, 2006, 2008, 2009; Evans *et al.*, 2010; Grab *et al.*, 2013; Pettis *et al.*, 2013; Battaglin *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Sviridov *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Bento *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2016; Baglan *et al.*, 2018; Gill *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Lupi *et al.*, 2019; Tahir *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2020a; Smith *et al.*, 2021).

Las abejas se encuentran expuestas a este herbicida a través de la recolección de polen, néctar o agua, que llevan a la colonia (Battaglin *et al.*, 2014; Rubio *et al.*, 2014; Berg *et al.*, 2018). Estudios recientes han demostrado que el glifosato altera la estructura y composición de la microbiota intestinal de las abejas (Motta *et al.*, 2018, 2020a, 2020b; Blot *et al.*, 2019; Castelli *et al.*, 2021) y que juega un papel importante en el metabolismo, crecimiento, desarrollo, inmunidad y defensa contra patógenos (Engel *et al.*, 2016; Raymann *et al.*, 2018). Adicionalmente, redujo la supervivencia y causó defectos de aprendizaje asociados con las conductas de alimentación, regreso a la colmena y vuelo (Farina *et al.*, 2019; Tomé *et al.*, 2020). Por otra parte, se ha detectado glifosato tanto en polen, néctar y miel como en larvas de abejas (Rubio *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2014, 2019; Chamkasem & Vargo, 2017; Karise *et al.*, 2017; Kyriakopoulou *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2017a; Berg *et al.*, 2018; Zoller *et al.*, 2018; Ferreira de Souza *et al.*, 2020), y adicionalmente reviste una amenaza indirecta al reducir la disponibilidad de recursos nutricionales (Bohan *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2018). Su efecto negativo podría verse potenciado por la interacción con plagas y patógenos (Higes *et al.*, 2013; Castelli *et al.*, 2021).

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar una evaluación del efecto *in vitro* de los agroquímicos thiametoxam, imidacloprid, clorpirifós y glifosato sobre abejas melíferas adultas a partir de un ensayo de toxicidad oral aguda.
2. Evaluar la respuesta en los ensayos de toxicidad oral aguda para dos haplogrupos de abejas melíferas, C1 (perteneciente a linaje materno europeo) y A4 (perteneciente a linaje materno africano) con el objeto de analizar posibles diferencias en la tasa de mortalidad.

1.4. HIPÓTESIS

1. Existen variaciones en los mecanismos de resistencia, tolerancia y/o desintoxicación entre los distintos linajes maternos de *A. mellifera* que permiten afrontar los efectos producidos por los agroquímicos de manera diferencial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de los ensayos de toxicidad oral aguda *in vitro* en abejas obreras se empleó la metodología propuesta por Medrzycki *et al.* (2013), con modificaciones; y la guía de la OECD -Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo- para análisis de toxicidad oral aguda y químicos.

2.1 Tratamientos y cálculo de las dosis estudiadas

Se utilizaron cuatro agroquímicos (tratamientos) de diferente naturaleza química: glifosato, thiametoxam, imidacloprid y clorpirifós. Se analizaron 5 dosis para cada uno de ellos, con 5 réplicas por dosis. Las concentraciones y dosis utilizadas fueron calculadas en base a la revisión de estudios de toxicidad realizados en el mundo y en la región, de acuerdo con los valores de pesticidas y residuos de dichos agroquímicos hallados en el ambiente (Belzunces *et al.*, 1999; Laitinen *et al.*, 2007; Bott *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2010; Laurino *et al.*, 2011; Kairo *et al.*, 2017).

Las dosis utilizadas fueron 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 µg/L (correspondientes a 2×10^{-7} , 2×10^{-6} , 2×10^{-5} , 2×10^{-4} , 2×10^{-3} microgramos de principio activo por abeja -µg p.a/abeja-). Para la preparación del alimento correspondiente a cada tratamiento, se realizó una dilución en jarabe estéril de sacarosa 50% p/v en concentración de 100ug/L, en un volumen de 10ml y en relación a la concentración inicial de cada principio activo. Luego se realizaron diluciones seriadas 1/10 para las concentraciones restantes.

Para el control tóxico, se utilizó dimetoato [IUPAC: 0,0-dimetil-S (N-metil-carbonilmetil) fosforoditioato] (Gough *et al.*, 1994), para el que el rango de concentraciones se encuentra estandarizado (Medrzycki *et al.*, 2013), con 5 réplicas por dosis. El control negativo de toxicidad se realizó sobre 15 unidades experimentales por tratamiento, provistas de jarabe de sacarosa estéril al 50% p/v.

2.2. Diseño y preparación de las unidades experimentales. Enjaule de material vivo

Se diseñaron y utilizaron unidades experimentales en base a las utilizadas por Alaux *et al.* (2010a), que permitieran medir los efectos de las diversas formulaciones sobre las abejas.

Cada unidad experimental (Figura 4.6) consistió en un frasco de acrílico transparente de 6,5cm de diámetro por 6cm de alto, con tapa ranurada (agujeros menores a 2mm de diámetro) para permitir ingreso de aire, y un orificio sobre el lateral del frasco cercano a la base, de aproximadamente 9mm de diámetro, para introducción del alimentador. Este último orificio fue inicialmente bloqueado, durante la fase de alimentación con formulaciones de agroquímicos, y luego albergó un alimentador.

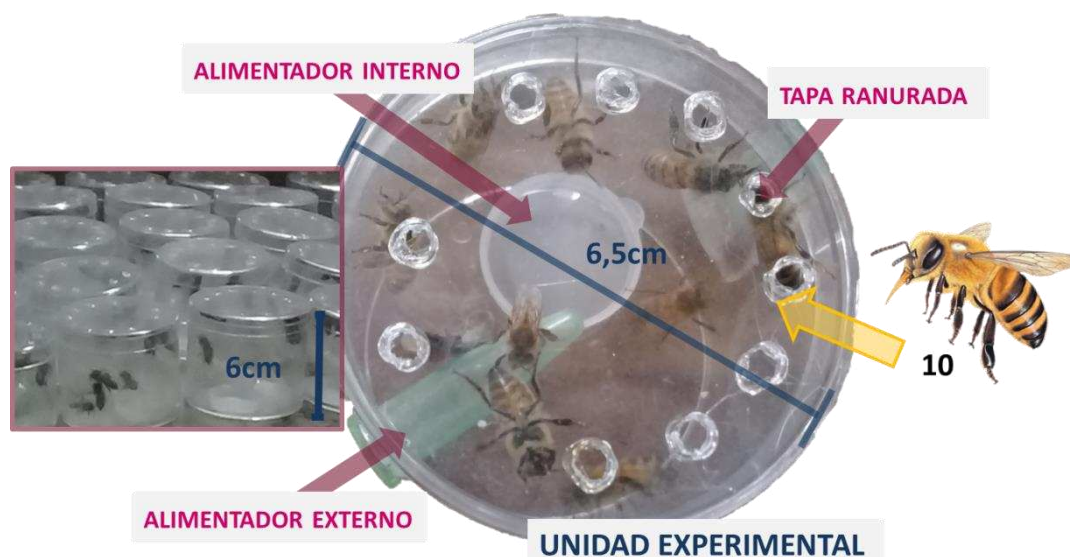


Figura 4.6 – Fotografías con detalle y dimensiones de las unidades experimentales utilizadas.

Dos tipos de alimentadores fueron utilizados en las diferentes etapas de estos ensayos. Cada unidad experimental fue inicialmente provista de un alimentador interno de material plástico opaco de 2cm de diámetro y un borde de 3mm de alto, que contendría el tratamiento a probar en cada caso. Las dimensiones del dispositivo permitieron que las abejas pudieran alimentarse sin quedar atrapadas dentro del mismo. El segundo alimentador –externo-, utilizado en la etapa de evaluación de la mortalidad postratamiento, consistió un tubo eppendorf™ de 2,5ml transparente al que se le realizó un orificio en una de sus paredes laterales, cercano a la base del tubo, y que contenía una pequeña cantidad de fibras de algodón embebidas en jarabe de sacarosa 50%p/v estéril, que permitió la alimentación de las abejas durante el transcurso del experimento. Se realizó su reemplazo cada 24hs para garantizar la disponibilidad de alimento.

Los ensayos se realizaron sobre dos grupos de abejas, uno de linaje materno europeo (haplogrupo mitocondrial C1), colectadas en el apiario de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata y, otro de linaje materno africano (haplogrupo mitocondrial A4), colectado en el apiario de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán. Las colmenas utilizadas para este ensayo presentaban reina presente, sanidad controlada, no exhibían signos clínicos de ninguna enfermedad, ni experimentaron exposiciones previas a agroquímicos.

Se recolectaron abejas que se hallaban sobre los cuadros internos de la cámara de cría de las colmenas, de modo de obtener abejas jóvenes. La colección se realizó sin emplear humo de manera de evitar el consumo de miel y el posterior rechazo del alimento otorgado en cada tratamiento. Las abejas fueron anestesiadas con dióxido de carbono (CO₂) durante 5 segundos para introducirlas en grupos de 10 individuos en cada unidad experimental (Figuras 4.6 y 4.7). Luego de su recuperación espontánea, se reemplazaron aquellas que no mostraron signos vitales.

Se confeccionó un lote de 25 frascos para cada tratamiento, 30 frascos para cada control tóxico, y 15 frascos para cada control negativo de toxicidad.

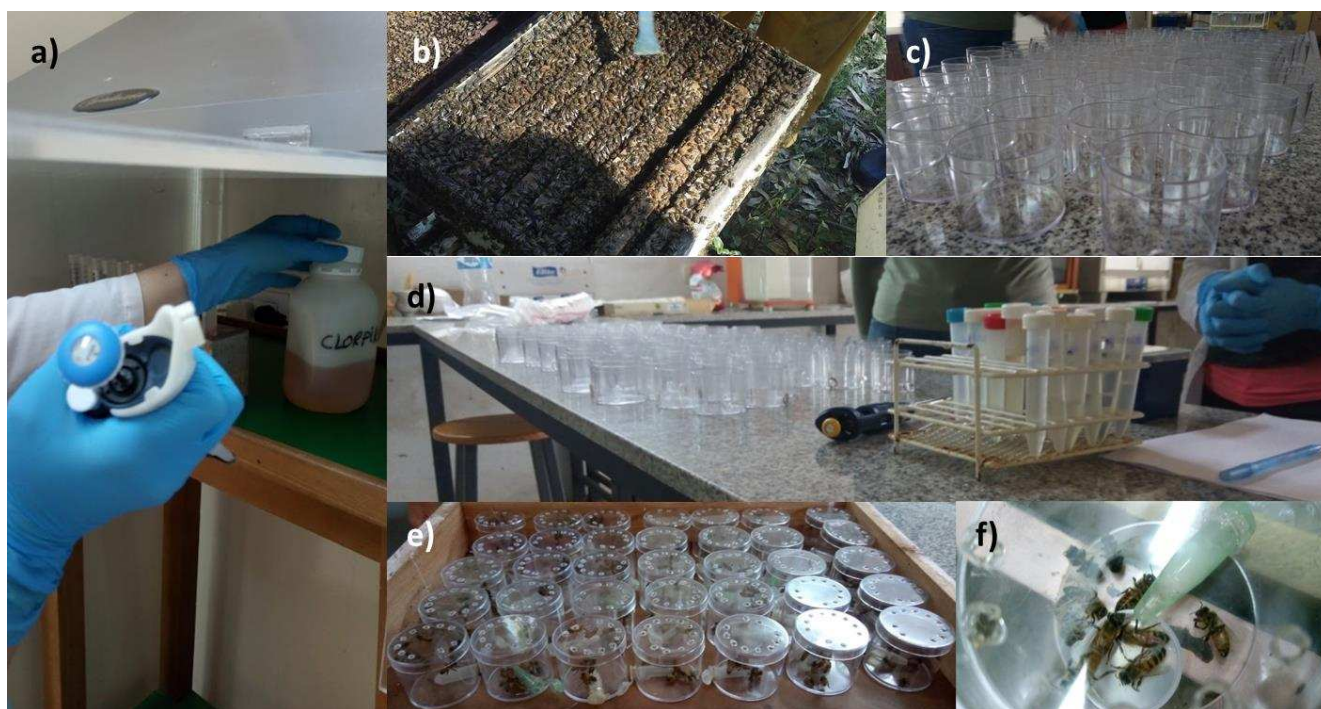


Figura 4.7 – Fotografías de las diferentes etapas del ensayo *in vitro*: a) Preparación de las diluciones de trabajo de los agroquímicos; b) Colección de las abejas a campo; c) Preparación de las unidades experimentales; d) Preparación del ensayo; e) Lote de unidades experimentales; f) Conteo de abejas muertas en unidades experimentales.

2.3 Ensayos *in vitro*

Los ensayos fueron realizados en el laboratorio del Curso de Producción Animal I de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - UNLP, y en el laboratorio de la Cátedra de Producción de Animales de Granja de la Facultad de Agronomía y Zootecnia - UNT, durante los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre de 2018.

Luego de preparar las unidades experimentales, se procedió a la alimentación con los tratamientos, una vez que las abejas se encontraron recuperadas de la anestesia. Cada unidad fue provista de 200µl de la formulación de jarabe de sacarosa (50% p/v en agua destilada estéril) y la concentración específica de agroquímico para cada tratamiento, que fue depositada en el alimentador interno permitiendo la alimentación *ad libitum* (20µl por abeja).

Se separaron los frascos por lote, según el tratamiento y las dosis (Figura 4.7), que fueron ubicados en una sala incubadora, para poder controlar las condiciones de temperatura y humedad, de manera de recrear lo más fielmente posible las condiciones halladas dentro de la colmena. Las salas se mantuvieron en oscuridad, la temperatura ambiente osciló entre 26°C +/- 2°C y la humedad relativa aproximada se encontró entre 60-70%. La ubicación de los lotes fue aleatoria, sin mezclar tratamientos, ni tratamientos con controles, para evitar contaminación cruzada entre los productos por volatilización.

Luego del consumo total del tratamiento, las abejas fueron alimentadas con un alimentador externo, ubicado en el orificio lateral de cada unidad experimental (Figura 4.6), que proveyó a las abejas de jarabe de sacarosa

durante todo el ensayo. Las réplicas del control negativo de toxicidad fueron alimentadas inicialmente con 200µl de sacarosa 50%p/v, agregándoles los alimentadores externos al mismo tiempo que el resto de los tratamientos.

Cada lote de individuos se mantuvo dentro del frasco en que se lo enjauló durante todo el ensayo para evitar contacto entre abejas de diferentes tratamientos.

La mortalidad en cada réplica fue evaluada a las 24, 48 y 72hs posteriores a la alimentación con los tratamientos, por conteo de abejas muertas.

2.4 Análisis estadísticos

Los rangos estándares de respuesta para análisis de toxicidad oral aguda de los controles (Medrzycki *et al.*, 2013; OECD, 1998; CEB, 2011) fueron comparados con los resultados obtenidos en los ensayos de dimetoato y sacarosa, para la validación de los análisis realizados.

Los datos fueron analizados con el software RStudio versión 2023.12.1+402. Tanto la normalidad como la homogeneidad de varianzas de los sets de datos se evaluaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y Fligner-Killeen. Las diferencias entre los grupos control y las dosis de cada tratamiento y, entre los grupos pertenecientes a haplogrupos mitocondriales europeos y africanos correspondientes a las dosis de cada tratamiento a las 24, 48 y 72hs, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. En el caso de diferencias significativas se utilizaron pruebas de suma de rangos de Wilcoxon por pares con corrección de continuidad para comparaciones posteriores.

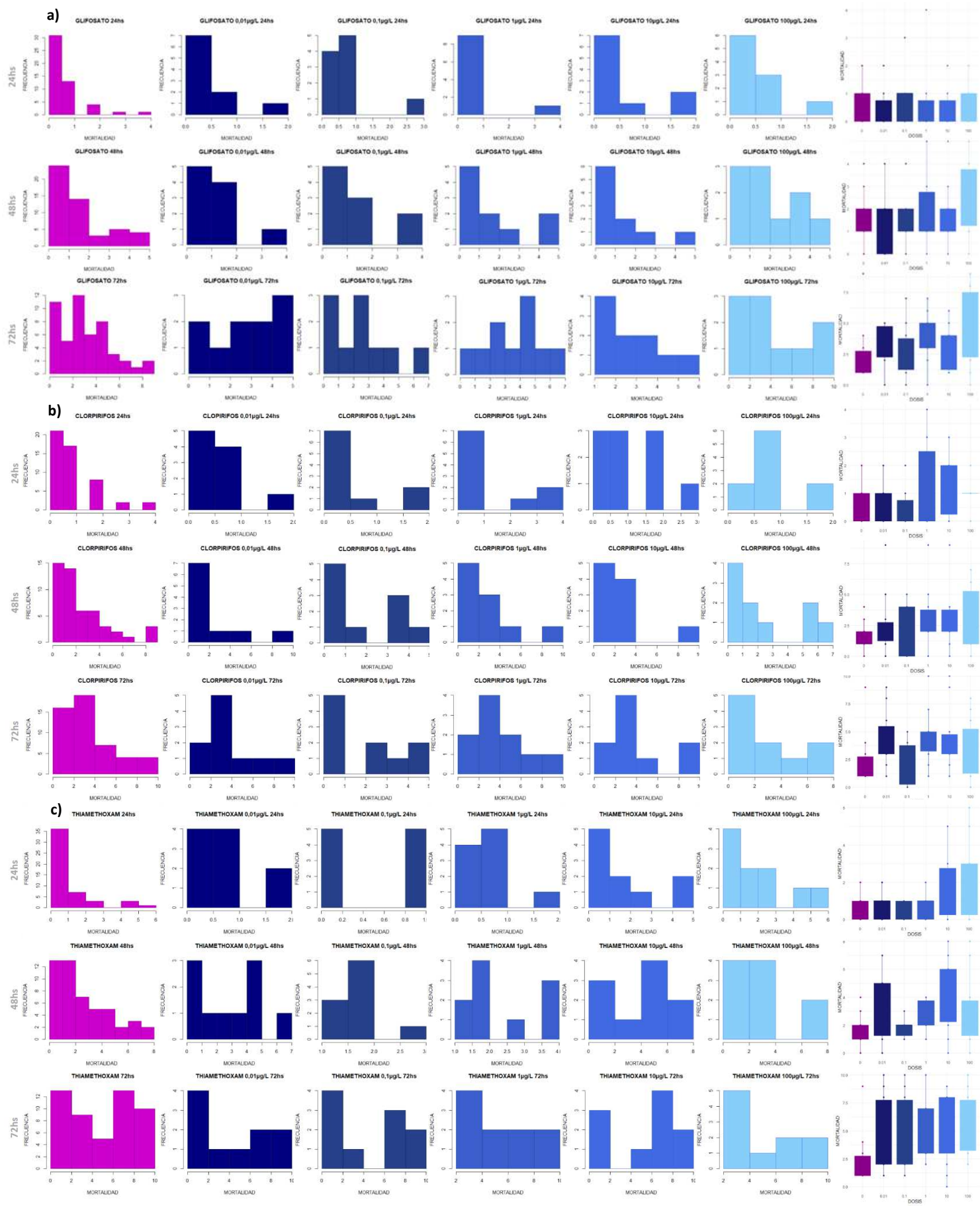
Adicionalmente se realizaron análisis estadísticos con los programas PROBIT Versión 1.5 y GraphPad Prism 8.0.1 a fin de evaluar la DL_{50} de cada pesticida. Los resultados y aplicación de ambos programas serán analizados en el apartado discusión.

3. RESULTADOS

Las mortalidades observadas en los controles se encontraron dentro de los rangos estándares para análisis de toxicidad oral aguda, validando los ensayos realizados. Mientras que los controles de sacarosa no superaron el 10% de mortalidad total en ningún caso, el control tóxico presentó una mortalidad entre el 40% y 50% para las dosis más bajas y entre un 80% y 100% para las dosis más altas probadas.

3.1. Comparación de los valores de mortalidad entre dosis empleadas y controles no tóxicos, para las 24, 48 y 72hs.

La distribución de las frecuencias de mortalidad para cada agroquímico se encuentra en las figuras 4.8a, b, c y d, discriminadas por tiempo y dosis. En los diagramas de cajas y bigotes se puede observar la distribución de la mortalidad de cada dosis en comparación con el control blanco.



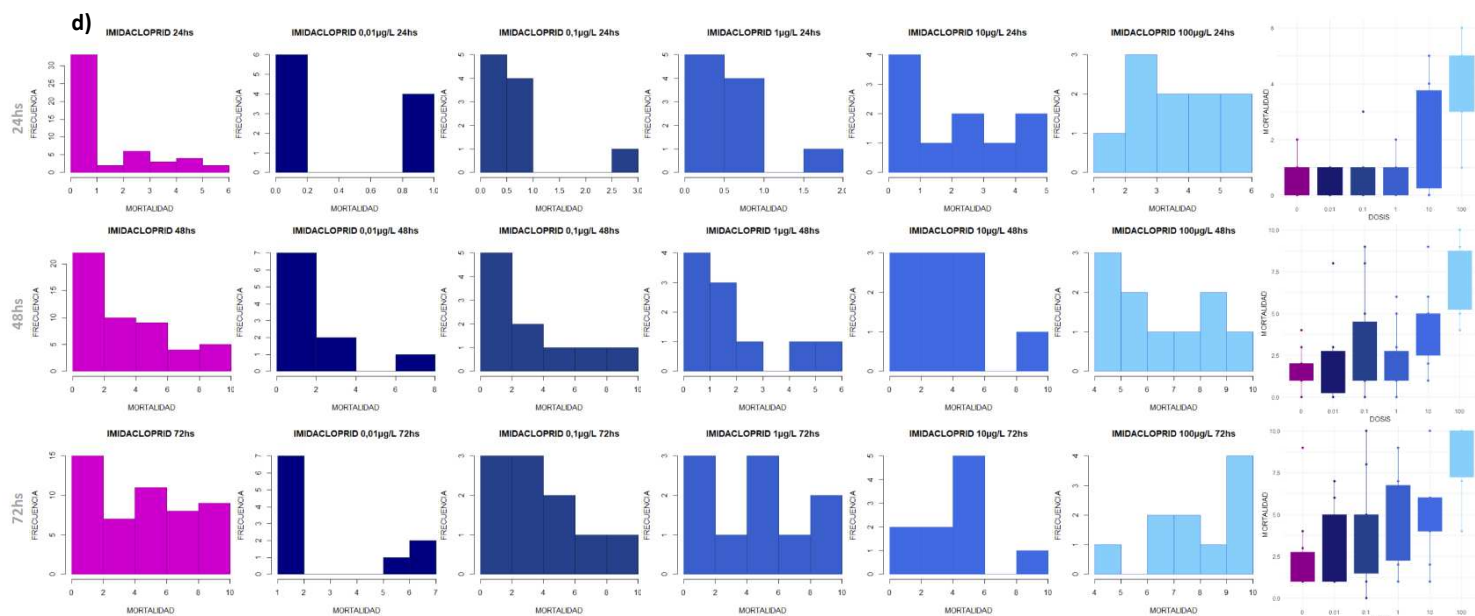


Figura 4.8 – Gráficos de distribución de frecuencias de mortalidad discriminados por horario de medición. A la izquierda, en magenta, se pueden observar los gráficos de la distribución de mortalidad para cada agroquímico, sin distinción de dosis. En el centro, en distintos tonos de azul se incluyen los gráficos por dosis, para las 5 dosis de cada tratamiento (0,01µg/L; 0,1µg/L; 1µg/L; 10µg/L y 100µg/L). En los diagramas de cajas y bigotes, a la derecha, se puede observar la distribución de la mortalidad de cada dosis (manteniendo los colores de los gráficos individuales) en comparación con el control blanco (en magenta).

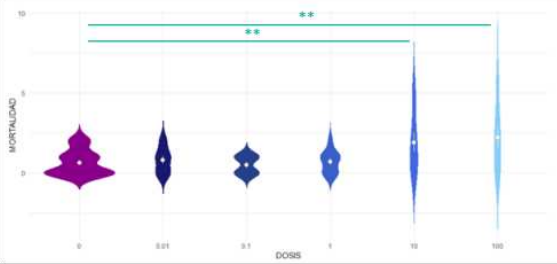
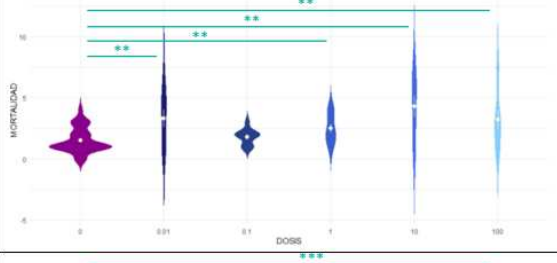
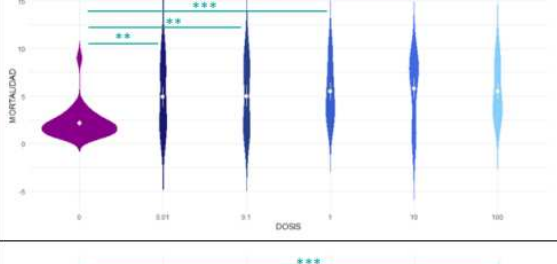
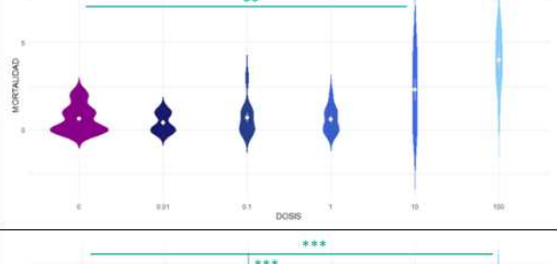
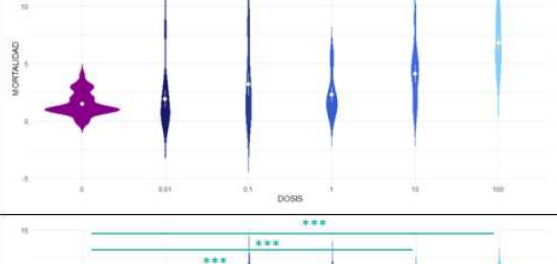
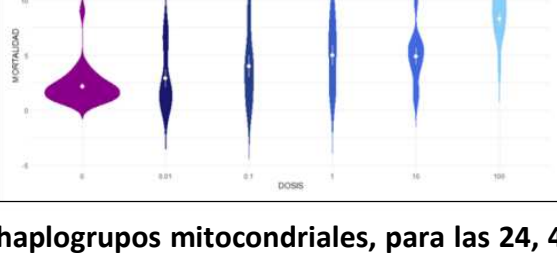
a) GLIFOSATO, b) CLORPIRIFOS, c) THIAMETHOXAM, d) IMIDACLOPRID

La evaluación de la mortalidad de las dosis probadas por comparación con los controles no tóxicos para las 24, 48 y 72hs mostraron diferencias estadísticamente significativas entre controles y tratamientos en algunos casos, con valores de $p < 0,05$. Los resultados de las pruebas de Wilcoxon-Mann-Whitney, con los valores de p para cada comparación y los gráficos correspondientes a cada análisis, se exponen en la tabla 4.1.

Los resultados del análisis para glifosato no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las dosis para las 24 y 48hs, sin embargo para las 72hs, se observaron diferencias significativas entre el control y las dosis 1µg/L y 100µg/L. En el caso de clorpirifós, no se evidenciaron diferencias entre el control blanco y las dosis del tratamiento a las 24hs, pero las diferencias fueron estadísticamente significativas al comparar el control con las dosis 0,1 µg/L y 1µg/L, a las 48hs y, el control con las dosis 0,01µg/L, 1µg/L y 10µg/L a las 72hs. Para los neonicotinoides, se hallaron diferencias en todos los horarios. Thiamethoxam exhibió diferencias entre el control y las dosis 10µg/L y 100µg/L para las 24hs de tratamiento; 0,01 µg/L, 1µg/L, 10µg/L y 100µg/L para las 48hs; y para todas las dosis a las 72hs. Mientras tanto, Imidacloprid mostró diferencias entre el control y las dosis 10µg/L y 100µg/L para las 24 y 48hs, y 1µg/L, 10µg/L y 100µg/L para las 72hs.

Tabla 4.1 – Resultados de las pruebas de Wilcoxon-Mann-Whitney, con los valores de p correspondientes a cada comparación. Adicionalmente, se incluyen los gráficos de violín correspondientes a cada análisis, para las 24, 48 y 72hs. En los diagramas se puede observar la mortalidad de cada dosis [(0,01µg/L; 0,1µg/L; 1µg/L; 10µg/L y 100µg/L), en tonos de azul] en comparación con el control blanco (en magenta). Los códigos de significancia para los valores de p expresados en los gráficos son: 0 '***'; 0.001 '**'; 0.01 '*'; 0.05 '.'; 0.1 ''; 1.

TIEMPO (hs)	TRATAMIENTO	DOSIS [µg/L]					GRÁFICO
		0,01	0,1	1	10	100	
24	GLIFOSATO	W = 175.5 p = 0.3785	W = 135.5, p = 0.6314	W = 173 p = 0.4284	W = 168.5 p = 0.5269	W = 163 p = 0.6632	
48		W = 167.5 p = 0.5767	W = 140.5 p = 0.7646	W = 134.5 p = 0.618	W = 153.5 p = 0.9197	W = 106 p = 0.1544	
72		W = 91.5 p = 0.0625	W = 113 p = 0.2373	W = 61.5 p = 0.004725	W = 104 p = 0.1393	W = 87.5 p = 0.04555	
24	CLORPIRIFOS	W = 150.5 p = 1	W = 168.5 p = 0.5269	W = 116.5 p = 0.2626	W = 102 p = 0.1093	W = 106 p = 0.1409	
48		W = 113.5 p = 0.2377	W = 143 p = 0.8317	W = 70 p = 0.009577	W = 81 p = 0.02482	W = 115.5 p = 0.2626	
72		W = 61 p = 0.004303	W = 154 p = 0.9102	W = 52.5 p = 0.001789	W = 60 p = 0.003886	W = 120 p = 0.3384	

24	THIAMETHOXAM	W = 131 p= 0.5274	W = 157.5 p= 0.8082	W = 138 p= 0.6933	W = 90 p= 0.04595	W = 80.5 p= 0.02102	
48		W = 79 p= 0.02036	W = 111.5 p= 0.2029	W = 77 p= 0.01657	W = 59.5 p= 0.003308	W = 86 p= 0.03623	
72		W = 81.5 p= 0.02758	W = 85 p= 0.03651	W = 34 p= 0.0002052	W = 74 p= 0.0152	W = 32 p= 0.0001614	
24	IMIDACLOPRID	W = 170 p= 0.4953	W = 148 p= 0.9587	W = 150.5 p= 1	W = 78 p= 0.01691	W = 9.5 p= 5.031x10 ⁻⁶	
48		W = 158 p= 0.8029	W = 110.5 p= 0.1988	W = 114.5 p= 0.2441	W = 48 p= 0.0008465	W = 1 p= 1.541x10 ⁻⁶	
72		W = 152.5 p= 0.9475	W = 95 p= 0.07904	W = 62 p= 0.004711	W = 47 p= 0.0009779	W = 6.5 p= 4.878x10 ⁻⁶	

3.2. Comparación de los valores de mortalidad entre haplogrupos mitocondriales, para las 24, 48 y 72hs.

Las comparaciones de mortalidad entre abejas de linaje europeo y africano arrojaron diferencias significativas entre ambos grupos para las 24, 48 y 72hs, con valores de $p < 0,05$ (Figura 4.9), con mayor mortalidad de abejas

del linaje materno europeo. Las comparaciones por pares entre tratamientos (agroquímicos utilizados), exhibieron diferencias significativas, aunque no para todos los tratamientos y horarios. En todos los casos en los que se presentaron diferencias significativas entre los haplogrupos mitocondriales analizados, el linaje materno europeo fue el que mayor mortalidad presentó. Los tratamientos correspondientes a thiamethoxam y glifosato mostraron diferencias significativas en la mortalidad de abejas por haplogrupo a las 24, 48 y 72hs (Figura 4.9 - THIAMETHOXAM, GLIFOSATO); mientras que clorpirifós sólo exhibió diferencias a las 72hs de ensayo (Figura 4.9- CLORPIRIFOS); e imidacloprid no presentó diferencias para ninguno de los horarios de toma de resultados (Figura 4.9- IMIDACLOPRID). Entre los agroquímicos que presentaron diferencias para la mortalidad de los linajes maternos, tanto glifosato como clorpirifós tendieron a exacerbar las diferencias entre los dos grupos genéticos analizados, conforme al aumento del tiempo de ensayo. Sin embargo, thiamethoxam presentó una respuesta inversa, tendiendo a suavizar las diferencias entre grupos conforme al aumento del tiempo de medición.

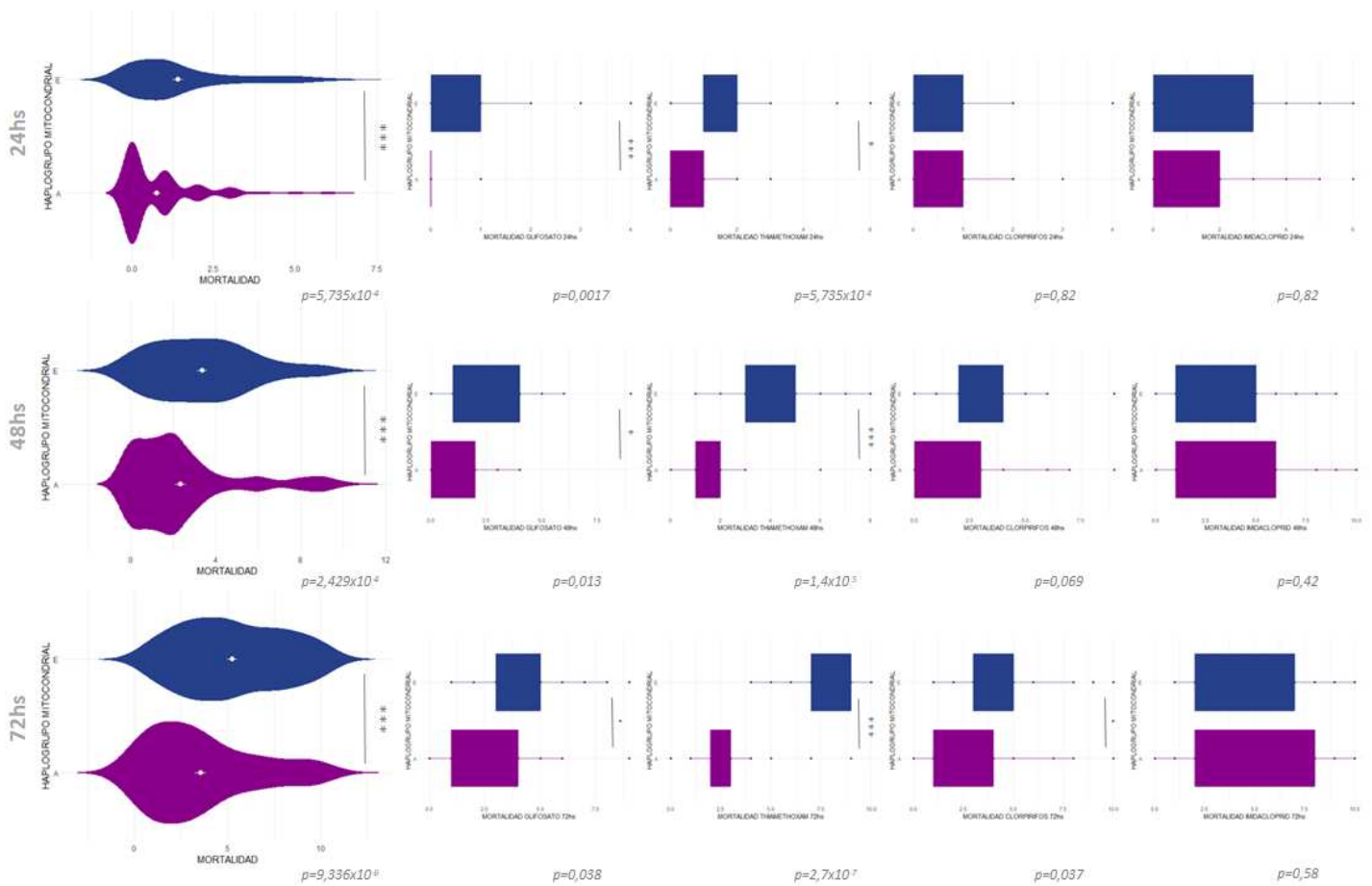


Figura 4.9 – Gráficos de comparación de los valores de mortalidad entre linajes maternos a partir de ensayos en dos haplogrupos mitocondriales -C1 y A4-, para las 24, 48 y 72hs. Los gráficos de violin corresponden al análisis comparado incluyendo todos los tratamientos. Los gráficos de caja corresponden a la comparación de las respuestas de ambos grupos, por tratamiento. Cada gráfico de cajas contiene la referencia del tratamiento y el horario del ensayo. A y E refieren a los linajes evaluados africano y europeo, respectivamente, y el valor de p corresponde a los análisis de Wilcoxon-Mann-Whitney. Los códigos de significancia para los valores de p expresados en los gráficos son: 0 '***', 0.001 '**', 0.01 '*', 0.05 '.', 0.1 ' ', 1.

No fue posible determinar la DL_{50} para ninguno de los agroquímicos debido a la distribución de las observaciones entre las dosis probadas. Para los análisis realizados con el programa PROBIT Versión 1.5, no fue posible normalizar la totalidad de las distribuciones con ninguna de las correcciones por mortalidad del control no tóxico probadas (Abbott, Henderson-Tilton y Schneider-Orelli).

Del mismo modo, se analizaron los datos con el programa GraphPad Prism 8.0.1, aplicando transformaciones según el tipo de asimetría de la muestra, utilizando un modelo de análisis de regresión no lineal y una curva de dosis-respuesta de tres y cuatro parámetros. Ninguno de los análisis realizados permitió ajuste de los modelos para la determinación de la DL_{50} .

4. DISCUSIÓN

La alteración del hábitat y el aumento en la aplicación de agroquímicos son considerados como factores importantes en la pérdida de colonias. Las abejas presentan un gran riesgo de exposición (Mullin *et al.*, 2010; Sanchez-Bayo *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Lundin *et al.*, 2015; Schmuck & Lewis, 2016; Broadrup *et al.*, 2019; Mayack *et al.*, 2022), particularmente a través de las flores de las que obtienen su alimento (Ohno *et al.*, 2010; Hitomi *et al.*, 2013; Wanzala & Ogoma, 2013; Peterson *et al.*, 2022). La escasa selectividad de muchos productos de uso agrícola tiene gran impacto en el ambiente particularmente para la entomofauna que contribuye en la polinización de cultivos y que no es blanco específico de su uso (Simon-Delso *et al.*, 2022). Adicionalmente, la variación en el grado de salud de las abejas se correlaciona con la presencia de plaguicidas (Mayack *et al.*, 2022), sugiriendo su importancia en la evaluación del estado general de las colonias.

Las pruebas de Wilcoxon-Mann-Whitney para la evaluación de la mortalidad entre las dosis probadas y el control no tóxico para las 24, 48 y 72hs, revelaron diferencias entre todas las dosis y el control, pero no para todos los tiempos ni para todos los tratamientos. En muchos casos, las dosis que produjeron muerte más rápido o de mayor cantidad de abejas fueron las dosis intermedias.

En los ensayos de neonicotinoides, las diferencias de mortalidad se observaron en todos los tiempos de medición, aunque con distinción entre las dosis. Los ensayos de imidacloprid mostraron diferencias significativas con el control aumentando la mortalidad en dosis cada vez más bajas conforme aumentó el tiempo del ensayo. Las dosis 10 μ g/L y 100 μ g/L mostraron diferencias para las 24 y 48hs, y 1 μ g/L, 10 μ g/L y 100 μ g/L para las 72hs. Sin embargo, thiamethoxam exhibió diferencias en las dosis 10 μ g/L y 100 μ g/L para las 24hs; 0,01 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L y 100 μ g/L para las 48hs; y en todas las dosis a las 72hs. Si bien en este tratamiento, también aumenta la mortalidad en dosis más pequeñas con el transcurso del tiempo, para las 24hs la dosis más baja (0,01 μ g/L) y la dosis intermedia (1 μ g/L) mostraron diferencias con el control, pero no la dosis entre ellas (0,1 μ g/L), lo que podría ser producto de los mecanismos olfativos de las abejas y de comunicación entre ellas, ya que tanto las concentraciones muy altas como muy bajas, pueden presentar menor resistencia para su ingesta. Es probable que las dosis menores de producto colocadas en el alimento no sean reconocidas por las abejas y presenten menor efecto en la mortalidad. En el caso de las dosis elevadas,

los productos agregados al alimento pueden no ser reconocidos al producir una sensación similar a la de parosmia en los glomérulos olfativos de las abejas, conduciendo a la elevada mortalidad por intoxicación incluso a las 24hs de tratamiento. En cambio, las concentraciones de las dosis intermedias pueden generar repelencia al alimento del tratamiento y restringir su consumo, llevando a las abejas a morir por falta de alimento o por efecto del contacto con el agroquímico, que conducen a la expresión de la mortalidad de manera más tardía que por ingesta del producto. Del mismo modo, puede existir una cierta tolerancia a determinadas dosis de productos que resultan tóxicos, por activación de mecanismos y enzimas que permitan la detoxificación. Al finalizar el ensayo, imidacloprid mostró diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad en las dosis mayores a $1\mu\text{g/L}$ (correspondientes a dosis superiores a $2 \times 10^{-5}\mu\text{g p.a/abeja}$), pero thiamethoxam lo hizo para todas las dosis probadas (dosis superiores a $2 \times 10^{-7}\mu\text{g p.a/abeja}$), mostrando una gran relación entre estos neonicotinoides y la mortalidad de las abejas en el ensayo. De la Mora *et al.* (2023), reportaron que thiamethoxam fue el principal factor de estrés asociado con la reducción de la supervivencia de las abejas en sus ensayos. La incidencia de estos productos en el ambiente ha sido analizada (Goulson, 2013) y su utilización fue temporalmente prohibida en 2013 (Han et al, 2018), y casi en forma total en 2018, en la Unión Europea (Blake, 2018). En lo que respecta a nuestro país, en diciembre del 2020 fue presentado un proyecto de Ley solicitando la prohibición de su utilización. Sin embargo, estos productos continúan representando el 75% de las ventas globales totales, aplicándose ampliamente en el continente americano (Bass *et al.*, 2015) y utilizándose de manera sistemática en Argentina. Es importante destacar que, sumado a los estudios de su implicancia en la disminución de colmenas (Desneux *et al.*, 2007; Maini & Aggarwal, 2010; Cresswell *et al.*, 2012; Farooqui *et al.*, 2013, Smith *et al.*, 2013), el 97% de los neonicotinoides ingresados en ellas en polen o néctar no proceden de plantas cultivadas y tratadas sino de plantas silvestres (Botías *et al.*, 2015). Esto aumenta las fuentes de contaminación y amplía las posibles ventanas de exposición. Adicionalmente, son un importante factor abiótico de riesgo para las colonias por su efecto sistémico (Simon-Delso *et al.*, 2015; Wood & Goulson, 2017) y su influencia en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Derecka *et al.*, 2013; Cook, 2019), pudiendo presentar múltiples efectos combinados con otras clases de pesticidas (Desneux *et al.*, 2007; Maini & Aggarwal, 2010; Blacquièrre *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2013; Biddinger *et al.*, 2013; Godfray *et al.*, 2014; Pisa *et al.*, 2015; Broadrup *et al.*, 2019; Tosi *et al.*, 2022) con un alto riesgo de acumulación (Haith, 2010) en suelo, sedimentos y agua (van der Sluijs *et al.*, 2015). Del mismo modo, se ha propuesto que pueden interferir en la modulación de la inmunidad, regulándola negativamente y aumentando la susceptibilidad a patógenos (di Prisco *et al.*, 2013; Pamminer *et al.*, 2018; Yordanova *et al.*, 2022).

Si bien el conocimiento de los efectos del herbicida glifosato en las abejas melíferas es escaso y existe una falta significativa de información sobre cómo afecta a abejas nativas (Seide *et al.*, 2018; Franklin & Raine, 2019; Orr *et al.*, 2020; Belsky & Joshi, 2020), ha sido calificado como altamente tóxico o con efectos negativos en el comportamiento fisiológico (Gomes, 2017; Seide *et al.*, 2018). Del mismo modo, la acción del organofosforado

clorpirifós ha sido registrada como de amplio espectro con efecto por contacto, y por vías intestinal y respiratoria (Akbar & Sultan, 2016; Wang, *et al.*, 2019).

Tanto para clorpirifós, como para glifosato no se registraron diferencias a las 24hs de tratamiento. Para la medición de las 48hs, el glifosato no presentó diferencias estadísticamente significativas, pero para las 72hs las dosis que exhibieron diferencias fueron 1µg/L y 100µg/L. Sin embargo, las concentraciones de clorpirifós que presentaron mayor mortalidad fueron 0,1µg/L y 1µg/L para las 48hs y 0,01 µg/L, 1µg/L y 10µg/L para las 72hs. Si bien el número de concentraciones que presentan diferencias en la mortalidad aumenta con el tiempo, no guardan relación con la disminución progresiva de las dosis. En este sentido, las concentraciones más altas generan mortalidad a partir de las 72hs de ensayo, pudiendo presentar menor incidencia que los neonicotinoides. En relación a ello, la dosis más baja puede presentar menor efecto mostrando diferencias en la mortalidad con el control a las 72hs de ensayo, mientras que las dosis intermedias podrían por un lado generar repelencia al alimento, produciendo la mortalidad solo de las abejas que lo consumieron, presentar efectos de intoxicación por contacto; o bien, pueden ser ingeridas por las abejas, generando mayores y más tempranos efectos que las dosis más elevadas.

Sumado a estos resultados, el glifosato registra cada vez más evidencia de sus efectos ecotoxicológicos sobre organismos no objetivo (Haughton *et al.*, 2001; Nosanchuk *et al.*, 2001; Laitinen *et al.*, 2006, 2008, 2009; Yamada *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2010; Grab *et al.*, 2013; Pettis *et al.*, 2013; Battaglin *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Sviridov *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Bento *et al.*, 2016; Cuhra *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2016; Baglan *et al.*, 2018; Gill *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Lupi *et al.*, 2019; Kaniserry *et al.*, 2019; Tahir *et al.*, 2019; Russo *et al.*, 2020a; Smith *et al.*, 2021; Zioga *et al.*, 2022). Para las abejas, juega un papel importante en el metabolismo, comportamiento, crecimiento, capacidades cognitivas, sensoriales, desarrollo, inmunidad y defensa contra patógenos (Engel *et al.*, 2016; Raymann *et al.*, 2018; Farina *et al.*, 2019). Altera la microbiota y afecta la inmunidad haciéndolas más susceptibles a infecciones (Higes *et al.*, 2013; Motta *et al.*, 2018, 2020a, 2020b; Blot *et al.*, 2019; Castelli *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2021). También, aumenta la expresión de algunas enzimas y del peróxido de hidrógeno (Bucekova *et al.*, 2014), siendo un marcador de inmunidad social (Alaux *et al.*, 2010b). Es capaz de modificar la expresión de genes asociados con la inmunidad, posiblemente representando una respuesta fisiológica para mitigar los efectos negativos del envenenamiento (Zhao *et al.*, 2020; Castelli *et al.*, 2021), que ha mostrado un acortamiento de la esperanza de vida (Castelli *et al.*, 2021). En adición a *V. ceranae* y DWV mostró una disminución severa del nivel de expresión de vitelogenina, importante para la división del trabajo de las obreras, la especialización en forrajeo, la longevidad de las reinas y la resistencia al estrés oxidativo, asociado con un forrajeo precoz y una reducción significativa de la supervivencia de las abejas (Amdam *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2007). Por otra parte, aumenta la expresión de genes de defensa (Zhao *et al.*, 2020) e inhibe la melanización, crítica para la protección inmune, al actuar como un antioxidante sinérgico, al igual que otros compuestos que contienen fosfatos (Smith *et al.*, 2021). Adicionalmente, causó defectos de aprendizaje en las conductas de alimentación, regreso a la colmena y vuelo (Farina *et al.*, 2019; Tomé *et al.*,

2020). Los efectos sub-letales podrían resultar en la reducción de los servicios de polinización, impactando en la producción de alimentos (Ledoux *et al.*, 2020). Por lo tanto, el glifosato no sólo puede interferir ampliamente con la inmunidad de los insectos, sino que tiene un alto potencial para influir en los sistemas fisiológicos (Smith *et al.*, 2021), y adicionalmente reviste una amenaza indirecta al reducir la disponibilidad de recursos nutricionales (Bohan *et al.*, 2005; Gill *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2018).

El impacto de los plaguicidas en la inmunidad de los insectos puede ser muy relevante (Alaux *et al.*, 2010a; James & Xu, 2012; Bucekova *et al.*, 2014; Pamminger *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2021; Castelli *et al.*, 2021; Yordanova *et al.*, 2022), conduciendo al estrés de las abejas por supresión inmune (Alaux *et al.*, 2010b; Pettis *et al.*, 2013). Específicamente el glifosato y algunos neonicotinoides, han mostrado interacciones con parásitos y patógenos con efectos negativos para las abejas (Claudianos *et al.*, 2006; Nazzi *et al.*, 2012; Prisco *et al.*, 2013; Nazzi & Pennacchio, 2014, 2018; Brandt *et al.*, 2016; Straub *et al.*, 2016; Coulon, 2017; Ciereszko *et al.*, 2017; Heard *et al.*, 2017; Rortais *et al.*, 2017; Siede *et al.*, 2018; Annoscia *et al.*, 2019; Broadrup *et al.*, 2019; Coulon *et al.*, 2020; Morfin *et al.*, 2020; Bruckner *et al.*, 2021; Castelli *et al.*, 2021; Bird *et al.*, 2021; Leska *et al.*, 2021; Ostermann *et al.*, 2022; Mayack *et al.*, 2022; Phocasem *et al.*, 2022) y, según Broadrup *et al.* (2019), las mayores tasas de infección de enfermedades en entornos naturales se encuentran asociadas al número de exposiciones a agroquímicos. Además de estas interacciones, han sido destacados diversos efectos de exposiciones simultáneas con otros factores estresantes (Bruckner *et al.*, 2021).

Es importante destacar que las abejas de las dosis que no difirieron significativamente del control en cuanto a la mortalidad, han presentado síntomas de intoxicación dentro de los descritos en la bibliografía (Nauen *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2004; Desneux *et al.*, 2007; Alaux *et al.*, 2010a; Maini *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012; Cresswell *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2012; James & Xu, 2012; Schneider *et al.*, 2012; Di Prisco *et al.*, 2013; Larson *et al.*, 2013; Nazzi & Pennacchio, 2014; Doublet *et al.*, 2015; Pisa *et al.*, 2015; Dussaubat *et al.*, 2016; Straub *et al.*, 2016; Sánchez Bayo *et al.*, 2016; Tison *et al.*, 2016; Grillone *et al.*, 2017; Broadrup *et al.*, 2019; Farina *et al.*, 2019; Havard *et al.*, 2020; Friedli *et al.*, 2020; Singla *et al.*, 2021; Schuehly *et al.*, 2021; Tosi *et al.*, 2022; Démares *et al.*, 2022), como temblores, descoordinación, hiperexcitación y en algunos casos parálisis previo a la muerte. Los síntomas de intoxicación estuvieron presentes en todas las abejas que permanecieron vivas durante el ensayo, incluso a las 24hs de tratamiento, a excepción del control no tóxico que no presentó ningún signo adjudicable a intoxicación.

Las comparaciones de mortalidad entre linajes europeo y africano mostraron diferencias significativas para las 24, 48 y 72hs, indicando una posible relación con la incidencia de los agroquímicos sobre ellos, con mayor mortalidad de abejas del linaje materno europeo en todos los casos. Las comparaciones por pares entre tratamientos exhibieron diferencias significativas para thiamethoxam y glifosato en todos los tiempos de toma de datos, y para clorpirifós a las 72hs de ensayo. En este sentido, el grado de incidencia de los agroquímicos podría estar relacionado a la presencia de diferencias entre haplogrupos o entre linajes, como fue expuesto

por Malaspina & Stort (1983) y Danka *et al.* (1986), probablemente en relación con la mayor sensibilidad olfativa que tienen las abejas con tasas más altas de comportamiento higiénico (Masterman *et al.*, 2001; Guarna *et al.*, 2005; Swansosn *et al.*, 2009; Mondet *et al.*, 2015, 2020), pudiendo expresarse dichas diferencias hasta cierto umbral de toxicidad. En el caso de imidacloprid, no se evidenciaron diferencias para ningún horario, lo que puede deberse a la gran mortalidad registrada para este producto, ya que dosis superiores a 2×10^{-5} µg p.a/abeja (1 µg/L) mostraron diferencias con el control no tóxico en los análisis generales.

Una hipótesis para los posibles mecanismos que podrían estar implicados en las diferencias es la activación de vías metabólicas para el procesamiento de los productos, o para su detoxificación, generando una cierta capacidad o rango de tolerancia, por encima del cual las diferencias entre haplogrupos desaparecerían. Estos mecanismos podrían actuar o activarse de manera diferencial en ambos linajes, dentro de determinados rangos de concentraciones de productos, con las limitaciones fisiológicas que puede presentar por acumulación de sus metabolitos o el grado de toxicidad que producen. Del mismo modo cumplirían un rol importante la presencia de receptores de desensibilización y la eficacia de las enzimas en el proceso de detoxificación, si se tiene en cuenta que la actividad enzimática es un indicador de exposición a agroquímicos (Badawy *et al.*, 2015).

Del mismo modo, teniendo en cuenta que estos productos generan inhibición de ciertas vías metabólicas y expresión de genes, y que existen ciertas diferencias en la presencia y activación de algunos genes asociados a comportamientos de acicalamiento y defensa entre haplogrupos (Locke, 2016; Martin-Hernandez *et al.*, 2018; Traynor *et al.*, 2020; Pusceddu *et al.*, 2021; Peck, 2021), podría existir una relación entre estas variables y las diferencias halladas en la mortalidad entre linajes maternos.

Entre los agroquímicos que presentaron diferencias para la mortalidad entre los linajes maternos, tanto glifosato como clorpirifós tendieron a exacerbar las diferencias conforme al aumento del tiempo de ensayo. Sugiriendo la posibilidad de activación de mecanismos de detoxificación más eficientes en las abejas de linaje materno africano, en relación a la capacidad de desintoxicación de los individuos (Simon-Delso *et al.*, 2022). Sin embargo, thiamethoxam presentó una respuesta inversa, tendiendo a suavizar dichas diferencias entre grupos conforme al aumento del tiempo de medición, pudiendo estar relacionado a la naturaleza y acción del agroquímico, ya que para ambos neonicotinoides probados no hubo diferencias y cuando éstas se expresaron, fueron reduciéndose con el aumento del tiempo de exposición. Estos resultados sugieren que independientemente del grado de tolerancia que pueda expresar un haplogrupo sobre otro, los neonicotinoides fueron altamente tóxicos para las abejas.

No fue posible determinar la DL_{50} para ninguno de los agroquímicos debido a la distribución de las observaciones entre las dosis probadas. El modelo de análisis de regresión con el programa PROBIT Versión 1.5, que obtiene la DL_{50} (EPPO, 2003) con un 95% de límite de confianza, a partir de la intersección de la gráfica obtenida con los datos para un $y=50$, asumiendo la condición de normalidad de la distribución de las tolerancias, no pudo ser utilizado, ya que no fue posible normalizar la totalidad de las distribuciones con

ninguna de las correcciones por mortalidad del control no tóxico probadas (Abbott, Henderson-Tilton y Schneider-Orelli) (Medrzycki *et al.*, 2013). Adicionalmente, el número de decimales que devuelve el programa, no permite observar valores de DL_{50} que contengan más de 2 decimales, en los casos en los que se pudo normalizar la distribución y generó resultados, no pudiendo obtener un valor certero cuando las cifras eran menores a 1×10^{-2} .

Las curvas del logaritmo de dosis versus respuesta siguen una forma sigmoidea simétrica, que permite determinar la DL_{50} del agonista, suponiendo que la curva de respuesta a la dosis tiene una pendiente estándar. Una pendiente de 1 es la esperada de una curva dosis-respuesta cuando un ligando se une a un receptor siguiendo la ley de acción masiva. El análisis de los datos con GraphPad Prism 8.0.1, permite determinar la pendiente a partir de la curva dosis-respuesta. En algunos casos de dosis probadas en este análisis, calculados con el 95% de límite de confianza y con transformaciones logarítmicas de los valores de dosis para ajustar los modelos no lineales, la distribución de los datos mostró una ‘curva planchada’, es decir que los datos obtenidos para todas las dosis, o para las dosis menores y mayores, muestran valores iguales o muy similares no pudiendo obtener la DL_{50} a partir de este método de análisis.

Estos resultados resaltan la necesidad de un análisis de obtención de la DL_{50} que se adecue a las variaciones de las muestras biológicas. Aunque la dosis letal media proporciona un valor bruto en sí, con un significado limitado para la salud general de las abejas, es una herramienta útil para el cálculo del coeficiente de riesgo (relación entre la exposición potencial a una sustancia y el nivel en el que no se esperan efectos adversos). Sumado a ello, el diseño experimental probablemente contribuye a la complejidad en la comparación de observaciones entre múltiples estudios (Medrzycki *et al.*, 2013; van der Sluijs *et al.*, 2015), ya que en la actualidad existen diversos protocolos de análisis que en numerosas ocasiones no permiten comparar resultados.

Aunque aún es insuficiente la información sobre las concentraciones reales de plaguicidas a las que las abejas se encuentran expuestas en el ambiente (Kyriakopoulou *et al.*, 2017), es importante destacar la relevancia tanto de la ruta de exposición (Zioga *et al.*, 2020), como la aplicación sola o combinada de los agroquímicos (Côté *et al.*, 2016; Straub *et al.*, 2020; Bird *et al.*, 2021; Siviter *et al.*, 2021). Por otra parte, es importante tener en cuenta el periodo de carencia de un producto, ya que se encuentra estrechamente relacionado con los límites máximos de residuo que puede tener un alimento que sea destinado a consumo humano o animal. De este modo, es importante realizar análisis de residuos en polen y néctar, ya que muchos de los compuestos identificados en las colmenas y sus productos son plaguicidas o metabolitos derivados de ellos (Rainey *et al.*, 1978; Loader & Anderson, 1981; Dooley *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Ohno *et al.*, 2010; Seguridad Alimentaria Europea, 2013; Hitomi *et al.*, 2013; Wanzala & Ogoma, 2013). Particularmente, las concentraciones de glifosato en las plantas varían ampliamente (Farina *et al.*, 2019), y aunque los límites máximos de residuos se encuentran determinados para la mayoría de los productos vegetales destinados al consumo humano y para la miel (FAO, 2006; CODEX Alimentarius, 2013; Comisión Europea, 2013, 2020; Cuhra,

2015; EPA, 2020), se ha detectado en mieles en todo el mundo en concentraciones mayores (Rubio *et al.*, 2014; Chamkasem & Vargo, 2017; Berg *et al.*, 2018; Zoller *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2019; Pareja *et al.*, 2019; Ferreira de Souza *et al.*, 2020; Raimets *et al.*, 2020; EFSA, 2020; Bergero *et al.*, 2021). Adicionalmente, aunque se ha probado la contaminación con glifosato de plantas no objetivo a través del sistema radicular (Neumann *et al.*, 2006), tanto el polen como el néctar podría contener concentraciones más altas de producto después de varios días de la aplicación, conduciendo a una mayor contaminación de la miel y los productos de la colmena (Zioga *et al.*, 2022). En este sentido, los valores límite son de gran relevancia porque dentro de las colonias, los agroquímicos podrían concentrarse aún más por evaporación al producir la miel luego de la recolección de néctar de fuentes contaminadas, que luego se incorpora al pan de abeja (Seeley, 1995) o se destina a consumo humano.

Tanto para las abejas melíferas como para otras abejas sociales, la colonia es la unidad de reproducción, y las pérdidas de abejas individuales pueden tolerarse hasta cierto nivel sin consecuencias para la supervivencia, aunque el número de exposiciones a una fuente de agroquímicos en particular puede tener un efecto acumulativo en la salud de las abejas individuales que lleve a consecuencias en las colmenas (Broadrup *et al.*, 2019; Mayack *et al.*, 2022). Es de suma importancia realizar pruebas a campo que determinen los efectos de los agroquímicos sobre las abejas que pecorean los cultivos, teniendo en cuenta los distintos orígenes genéticos de cada población, al igual que cuáles son los residuos más ampliamente hallados en polen y néctar, y analizar la peligrosidad de estos productos para las abejas.

Los resultados de este capítulo contribuyen a demostrar el efecto nocivo del uso generalizado de pesticidas en la salud de las abejas melíferas, aunque el rol de la exposición ambiental y los mecanismos implicados en dichos efectos, deben ser estudiados con mayor profundidad. Teniendo en cuenta que la toxicidad crónica podría estar causada por acumulación de producto (Gill *et al.*, 2012; Rondeau *et al.*, 2014; Broadrup *et al.*, 2019; Mayack *et al.*, 2022) y que las exposiciones orales podrían encontrarse dentro de las más preocupantes debido a su mayor toxicidad relativa (Alkassab *et al.*, 2017), es necesaria la complementariedad de los análisis para evaluar el grado de toxicidad aguda, crónica, oral y por contacto, y de ensayos a campo con el fin de establecer regulaciones de uso, propias de cada región agrícola y climática, de modo de disminuir o anular el efecto nocivo sobre la fauna útil para los cultivos y el ecosistema. Las diferencias entre los signos de intoxicación evidenciados en los tratamientos respecto de los controles no tóxicos en los análisis de toxicidad aguda, sugieren la necesidad de realizar ensayos más completos, debido a que los productos pueden presentar efectos sub-letales que amenazan directamente la salud y la supervivencia de las abejas. Del mismo modo, los estudios parcializados no presentan en sí mismos información completa sobre el accionar de un producto, pudiendo conducir a implementación de medidas que no tomen en cuenta la inhabilitación de la realización de actividades y la disminución de la vida útil de las abejas, como tampoco la afección que genera tanto a la colonia como a los productos que de ella derivan. Por ello, es importante consensuar protocolos de aplicación que permitan analizar de manera holística el accionar de agroquímicos, teniendo en cuenta mayor cantidad de

variables en cuanto a la afección a corto, mediano y largo plazo que pueden tener sobre las poblaciones de abejas, para poder implementar políticas de aplicación de productos y de manejo de los apiarios linderos a producciones agrícolas, como políticas públicas que permitan la convivencia de todas las producciones a campo. De igual modo, el importante efecto de los plaguicidas sobre la inmunidad de las abejas debería recibir más atención en la definición de nuevos protocolos para la evaluación de riesgos y el estudio sobre la interferencia de los plaguicidas con la compleja red ecológica existente en el microcosmos de la colmena (Annoscia *et al.*, 2020).

Otros análisis como la repelencia o reconocimiento de las sustancias químicas en el alimento deben ser explorados, debido a que, en el caso de análisis de ingesta, tiene un rol fundamental en el ensayo, así como las vías de comunicación que podrían verse implicadas en el reconocimiento de una fuente de alimento o de una sustancia tóxica, y las diferencias que podrían hallarse en la activación de estos mecanismos entre abejas de distintos orígenes genéticos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Si bien otros trabajos han expuesto la pertenencia de las poblaciones de *A. mellifera* de Argentina a linajes maternos y haplogrupos mitocondriales, este trabajo de tesis no sólo contribuye en su actualización, sino que exhibe la distribución de los mismos, en base a las regiones productivas asociadas a la fitogeografía del país, con determinaciones de nuevos haplogrupos (M7, M8, A2 y A7) y un análisis de dicha regionalización. Estos resultados se constituyen en una herramienta a futuro para la evaluación de la aplicación de manejos integrados, pudiendo ajustar las características a cada una de las regiones productivas según el haplogrupo y ecotipo de abeja que presenten.

Los análisis realizados permitieron interpretar la variabilidad genética en torno a las regiones muestreadas y sus características. La interacción entre el genotipo y el ambiente es un indicador de adaptaciones locales y *fitness*, y la conservación de la diversidad genética en las poblaciones de abejas es importante para preservar su gran adaptabilidad en diferentes zonas.

Con el fin de priorizar la conservación de las abejas con adaptaciones exitosas a regiones ecológicas particulares, estudiar la estructura genética de las poblaciones y su diversidad es la base del entendimiento de la biodiversidad y la conservación. Así, la ampliación de los esfuerzos de investigación es necesaria para poder establecer más y mejores estrategias de conservación, adaptadas a cada una de las regiones.

El estado sanitario de las abejas de nuestro país ha sido evaluado en numerosas ocasiones, generalmente de manera fragmentada o con un enfoque particular en un grupo reducido de patógenos o parásitos. En este trabajo se presenta una actualización exhaustiva del estado sanitario de las poblaciones de abejas en las 5 regiones productivas del país, con un análisis pormenorizado de cada una de las enfermedades previamente citadas como de mayor prevalencia (*Varroa destructor*, *Vairimorpha* spp., virus ARN, *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*). A su vez, se presentan los resultados de interacciones entre patógenos y parásitos que no han sido estudiadas previamente en el país y que requieren especial atención debido a su relación con el colapso de colmenas en otras regiones del mundo, señalando la necesidad de obtener más información sobre las limitaciones de la salud de las abejas melíferas. Particularmente en las actividades migratorias, el riesgo de transmisión de enfermedades es casi constante, y la reanudación de la actividad en primavera, es un momento importante para el desarrollo de la colonia influido tanto por las intervenciones realizadas por los apicultores en otoño e invierno, como por la aparición o emergencia de patógenos. Aunque las causas de la disminución de polinizadores son complejas y no existe consenso sobre ellas, las soluciones deben tender a la toma de decisiones que contribuyan a reducir o eliminar cualquier factor de *stress*. La identificación de las características etológicas, geográficas y genéticas que confieren resistencia a las colonias, junto con la comprensión de la biología de las abejas y la biología de los parásitos y patógenos en cada región, pueden ser utilizadas en la implementación de programas de mejoramiento. Por lo tanto, la determinación de la presencia de diferentes patógenos en las colonias, así como su origen, distribución,

condiciones ambientales y prácticas apícolas bajo las que se encuentran, puede ayudar a establecer la relación entre ellos para correlacionarlos con el desarrollo de enfermedades, y proporcionar datos para el establecimiento de políticas sanitarias a nivel nacional.

Asimismo, este trabajo contribuye en el análisis entre los linajes maternos presentes en el país en relación a la presencia y detección de patógenos como a la toxicidad oral aguda de agroquímicos presentes en el entorno apícola. La generación de efectos negativos en la salud de las abejas por parte de los pesticidas se encuentra en relación con la concentración del producto, su naturaleza, el órgano blanco sobre el que genera efecto y la vía de ingreso, aunque dentro de un cierto rango de condiciones esos efectos pueden ser retardados o contrarrestados por abejas de linaje materno africano. Contrariamente, pareciera no haber relación entre el origen materno de las poblaciones y la resistencia a enfermedades. La complejidad de las interacciones de los factores que producen *stress* en las poblaciones de abejas melíferas justifica trabajos futuros que aclaren los resultados de la presión simultánea de múltiples factores, especialmente para la evaluación de posibles riesgos producto de efectos interactivos. Si bien los programas de cría selectiva dirigidos a alcanzar el equilibrio entre los genotipos europeos y africanos podrían ser quizás el mejor compromiso para mantener las colonias de abejas melíferas sanas y fuertes en el continente americano, es necesario analizar e incluir otros factores determinantes en la salud de las colonias como la alimentación, el clima, la regionalización geográfica y los eventos de trashumancia. Esto podría contribuir a garantizar una apicultura más sostenible, además de proporcionar nuevos conocimientos sobre las interacciones de las abejas y sus estresores, las diferentes interacciones co-evolutivas huésped-patógeno y la importancia de la diversidad genética en la epidemiología de las enfermedades.

PERSPECTIVAS A FUTURO

PERSPECTIVAS A FUTURO

- Analizar la relación de los haplogrupos y las enfermedades con mayor prevalencia en el país desde una perspectiva biogeográfica, que permita integrar las características regionales de cada zona.
- Realizar análisis que involucren cuantificaciones de la carga de patógenos para poder confirmar la independencia del linaje materno en la tolerancia a enfermedades
- Realizar análisis de determinación del grado de introgresión de genes africanos, tanto maternos como paternos en las poblaciones, para evaluar la implicancia en la tolerancia a enfermedades.
- Analizar el proceso de africanización desde una perspectiva geográfica que se condiga con la distribución a campo, bajo la propuesta de áreas con mayor o menor porcentaje de introgresión de genes africanos en las poblaciones, reemplazando la determinación de límites virtuales.
- Ampliar los análisis genéticos de las poblaciones de abejas para evaluar la presencia de otros linajes en el país, su influencia en la producción y la necesidad de adecuación de los planes actuales de mejoramiento e inseminación para la mantención de características compatibles con la producción.
- Evaluar la participación de los distintos haplogrupos africanos y europeos en los procesos de hibridación y la mantención de características africanas en los híbridos que contribuyan positiva y negativamente a la producción.
- Analizar de manera exhaustiva la presencia del haplotipo M2 y su linaje de pertenencia, para asociarlo con su distribución y la posibilidad del aumento de los niveles de africanización de las poblaciones en PATAGONIA.
- Analizar la presencia de haplotipos raros, valiosos para comprender la evolución del linaje asociado a las prácticas apícolas y los cambios ambientales en el continente.
- Ampliar los análisis de agroquímicos en asociación al linaje materno de las poblaciones a partir del análisis de los genes que permiten entender los cambios que se encuentran detrás de la tolerancia de ciertas concentraciones de agroquímicos.
- Determinar la locación y origen de regiones genómicas útiles para colonias productivas que las hagan más resistentes a factores que actualmente las perjudican.
- Realizar análisis holísticos que permitan la evaluación de la interacción de factores estresores para las colonias de abejas, que contribuyan a comprender los mecanismos que subyacen a la disminución de las poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkader, B.F., Çakmak, İ., Çakmak, S.S. *et al.* (2021). Toxicity assessment of chronic exposure to common insecticides and bee medications on colony development and drones sperm parameters. *Ecotoxicology* 30, 806–817. DOI:10.1007/s10646-021-02416-3
- Abrahamovich, A.H., Atela, O., De la Rúa, P. & Galián, J. (2007). Assessment of the mitochondrial origin of honey bees from Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 46(3), 191-194.
- Acevedo-Gonzalez, J.P., Galindo-Cardona, A., Avalos, A., *et al.* (2019). Colonization history and population differentiation of the Honey Bees (*Apis mellifera* L.) in Puerto Rico. *Ecol Evol.* 00:1–8. DOI:10.1002/ece3.5330
- Adjlane, N. & Haddad, N. (2014). Detection of deformed wing virus in the local bee colonies *Apis mellifera intermissa* in Algeria and its relationship with *Varroa destructor*. *Mellifera* 14(27/28):3–10
- Adjlane, N. & Haddad, N. (2016). Effect of Some Honeybee Diseases on Seasonal Mortality of *Apis mellifera Intermissa* in Algeria Apiaries. *Proc. Zool. Soc* 71, 83–87. DOI: 10.1007/s12595-016-0188-5
- Adjlane, N. & Haddad, N. (2017). A bibliographic review on the most dangerous diseases of the honey bee. *Bio-Sci Res Bull.* 33(2):85–99. DOI:10.5958/2320-3161.2017.00011.6
- Adjlane, N., Badmazhapova, E., Berezin, A., Borodachev, A., Brandorf, A., Dar, S. A., Dukku, U.H., Eskov, E., Gajda, A., Gregorc, A., Gulov, A., Gushchina, E., Hatjina, F., Ilyasov, R.A., Kandemir, I., Kireeva, T., Konusova, O., Kucher, A., Kwon, H.W., Lee, M.-I., Mitrofanov, D., Ostroverkhova, N., Özkan-Koca, A., Pogorelov, Y., Raffiudin, R., Requier, F., Rodrigues, M., Seeley, T.D. & Yartsev, V. (2020) *Phylogenetics of bees*. Editors: Ilyasov R.A., Kwon H.W. Boca Raton, London, New-York: CRC Press Taylor & Francis Group. 290 pp. ISBN 9781138504233.
- Agostini, G. (2013). *Ecotoxicología de anfibios en agroecosistemas del noreste de la región Pampeana*. Universidad Nacional de la Plata, La Plata. (Tesis Doctoral)
- Agra, M.N., Conte, C.A., Corva, P.M., Cladera, J.L., Lanzavecchia, S.B. & Palacio, M.A. (2018). Molecular characterization of *Apis mellifera* colonies from Argentina: genotypic admixture associated with ecoclimatic regions and apicultural activities. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1–15. DOI:10.1111/eea.12719
- Aguirre-Buitrago, J., Narváez-González, S., Bernal-Vera, M. & Castaño-Ramírez, E. (2014). Contaminación de operarios con Clorpirifós por práctica de “Embolsado” de banano (*Musa* sp.) en Urabá, Antioquía. *Revista Luna Azul*, (38), 191-217.
- Ahmad, S. (2004). *Detection of chlorpyrifos and penconazole residues in Grape leaves and fruit by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* Facultad de Estudios de Postgrado. Universidad Nacional de An-Najah. (Tesis de Maestría)
- Aizen, M.A. & Harder, L.D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr Biol.* 9;19(11):915-8. DOI:10.1016/j.cub.2009.03.071. PMID: 19427214.
- Aizen, M.A., Aguiar, S., Biesmeijer, J.C., *et al.* (2019). Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology* 25, 3516– 27.
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A. & Klein, A.M. (2009). How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany.* 103(9):1579-1588. DOI:10.1093/aob/mcp076
- Akbar, S. & Sultan, S. (2016). Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 563-570. DOI:10.1016/j.bjm.2016.04.009
- Akinwande, K., Badejo, M. & Ogbogu, S. (2014). Hygienic behavioural mechanism of resistance to diseases and parasites in west african honey bee colonies *Apis mellifera adansonii* (Hymenoptera: apidae). *International Journal of Entomology Research* 2(2), 73-79.
- Al Naggar, Y. & Paxton, R.J. (2020). Mode of Transmission Determines the Virulence of Black Queen Cell Virus in Adult Honey Bees, Posing a Future Threat to Bees and Apiculture. *Viruses* 12, 535.

- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P. & Le Conte, Y. (2010a). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782. DOI:10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x
- Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H. & Le Conte, Y. (2011). Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genom* 12:496. DOI:10.1186/1471-2164-12-496
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D. & Le Conte, Y. (2010b). Diet effects on honeybee immune competence. *Biol. Lett.* 6 (4):562–565. DOI:10.1098 /rsbl.2009.0986.
- Albo, G.N. & Reynaldi, F.J. (2001). Caracterización morfológica y enzimática de aislamientos de *Ascosphaera apis* de distintos orígenes de Argentina. *Rev Argent Prod Ani* 22: 1-11.
- Albo, G.N. & Reynaldi, F.J. (2010). *Ascosphaera apis*, agente etiológico de la cría yesificada de las abejas. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 80
- Alburaki, M., Bertrand, B., Legout, H., Moulin, S., Alburaki, A., Sheppard, W.S., *et al.* (2013). A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genet.* 14, 117. DOI:10.1186/1471-2156-14-117
- Alburaki, M., Madella, S., Lopez, J., Bouga, M., Chen, Y. & vanEngelsdorp, D. (2022). Honey bee populations of the USA display restrictions in their mtDNA haplotype diversity. *Front. Genet.* 13:1092121. DOI:10.3389/fgene.2022.1092121
- Alburaki, M., Moulin, S., Legout, H., Alburaki, A. & Garnery, L. (2011). Mitochondrial structure of eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie* 42, 628–641. DOI:10.1007/s13592-011-0062-4
- Aldea P. & Rodríguez R. (2014). Factors affecting sanitary control of Varroa destructor in Chile. The IV COLOSS Workshop on Varroa control strategies in Bled, Slovenia May 22- 23. Abstract book pp. 32
- Alger, S. A., Burnham, P. A. & Brody, A. K. (2019). Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLoS ONE* 14, e0221800
- Alimentos Argentinos. (2017). Dirección Nacional de Alimentos y Desarrollo Regional. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía. <https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/>
- Alimentos Argentinos. (2024). Dirección Nacional de Alimentos y Desarrollo Regional. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía. https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/HomeAlimentos/documentos/CAT_Alimentos_Argentinos.pdf
- Alippi, A.M. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 24(2), 67–72
- Alippi, A.M., Reynaldi, F.J., López, A.C., De Giusti, M.R., & Aguilar, O.M. (2004). Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. *Journal of Apicultural Research* 43 (3): 135–143. DOI:10.1080/00218839.2004.111011 24.
- Alkassab, A. & Kirchner, W. (2017). Sublethal exposure to neonicotinoids and related side effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *J Plant Dis Prot.* 2017; 124:1–30.
- Allen, M. & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77, 141–162.
- Allen, M. & Ball, B.V. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77(3):141–162. DOI:10.1080/0005772X.1996.11099306
- Allen, M. F., Ball, B. V., & Underwood, B. A. (1990). An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55, 439– 440. DOI:10.1016/0022-2011(90)90090-S
- Allen, M.F., Ball, B.V., White, R.F. & Antoniw, J.F. (1986). The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *J Apic Res* 25(2):100–105. DOI:10.1080/00218839.1986.11100700
- Allendorf, F.W., Luikart, G. & Aitken, S.N. (2012). *Conservation and the Genetics of Populations*, 2nd ed.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA.

- Allen-Wardell, G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J., Cox, P. A., Dalton, V., Feinsinger, P., Ingram, M., Inouye, D., Jones, C. E., Kennedy, K., Kevan, P., Koopowitz, H., Medellín, R., Medellín-Morales, S. & Nabhan, G. P. (1998). The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology*, 12(1), 8-17. DOI:10.1046/j.1523-1739.1998.97154.x
- Alonso-Salces, R.M., Cugnata, N.M., Guaspari, E. *et al.* (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie* 48, 387–400.
- Alvarez, L.J., Reynaldi, F.J., Ramello, P.J., Genchi García, M.L., Sguazza, G.H., Abrahamovich, A.H. & Lucia, M. (2017). Detection of honey bee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Insectes Sociaux* 65:191–197. DOI:10.1007/s00040-017-0587-2
- Amakpe, F., De Smet, L., Brunain, M., Jacobs, F.J., Sinsin, B. & de Graaf, D.C. (2018). Characterization of Native HoneyBee Subspecies in Republic of Benin Using Morphometric and Genetic Tools. *J Apic Sci*. Available: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201800326425>.
- Amdam, G.V. & Omholt, W. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: The double repressor hypothesis. *J. Theor. Biol.* 223, 451–464.
- Anderson, C. & Ratnieks, F.L.W. (1999). Task partitioning in foraging: general principles, examples, efficiency and information reliability of queueing delays. En: *Information processing in social insects* (eds. C. Detrain, J. L. Deneubourg, y J. M. Pasteels). Birkhäuser, Berlin.
- Anderson, D.L. & Giacón, H. (1992). Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.* 85, 47–51.
- Anderson, D.L. & Trueman, J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 165–189. DOI:10.1023/A: 1006456720416.
- Anguiano-Baez, R., Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M.M., Espinosa-Montañón, L.G. & Correa-Benítez, A. (2016). *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) parasitism and climate differentially influence the prevalence, levels and overt infections of deformed wing virus in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Sci.* 16, 44.
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P. & Antúnez, K. (2015). Prevalence and distribution of honey bee pathogens in Uruguay. *J. Apic. Res.*
- Annoscia D, Brown SP, Di Prisco G, De Paoli E, Del Fabbro S, Frizzera D, Zanni V, Galbraith DA, Caprio E, Grozinger CM, Pennacchio F, Nazzi F (2019) Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proc R Soc B* 286:20190331. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0331>
- Annoscia, D., Di Prisco, G., Becchimanzi, A. *et al.* (2020). Neonicotinoid Clothianidin reduces honey bee immune response and contributes to *Varroa* mite proliferation. *Nat Commun* 11, 5887. DOI:10.1038/s41467-020-19715-8
- Antúnez, K. *et al.* (2007). Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary Microbiology* 124 (1–2): 178–183. DOI:10.1016/J. VETMIC.2007.04.012.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martín-Hernández, R., & Zunino, P (2015). Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*, 70 (2), 522–533. DOI:10.1007/s00248-015-0594-7
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E. & Zunino, P. (2005). Detection of chronic virus and acute bee paralysis virus in uruguayan honeybees. *J Invertebr Pathol* 90:69–72. DOI:10.1016/j.jip.2005.07.001
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G. & Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 67–70
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., vanEngelsdorp, D. & Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013-2014. *Apidologie*, 48: 364–370. DOI: 10.1007/s13592-016-0482-2

- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11, 2284–2290.
- Arai, R., Tominaga, K., Wu, M., Okura, M., Ito, K., Okamura, N., Onishi, H., Osaki, M., Sugimura, Y., Yoshiyama, M. *et al.* (2012). Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One.* 7: e33708.
- Aranzazu, D., Rodríguez, B., Vieco, B. & Restrepo, L. (2012). Efecto del Clorpirifós 0,0-dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato) en machos juveniles de tilapia (*Oreochromis* spp). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25 (2), 276-291.
- Arathi, H., Burns, I. & Spivak, M. (2000). Ethology of hygienic behavior in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): behavioral repertoire of hygienic bees. *Ethology* 106(4), 365-379.
- Arbulo, N., Antúnez, K., Salvarrey, S., Santos, E., Branchiccela, B., Martín-Hernández, R., Higes, M. & Invernizzi, C. (2015). High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 130 165–168. DOI:10.1016/j.jip.2015.07.018
- Arechavaleta-Velasco, M.E. & Guzman-Novoa, E. (2001). Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* 2001, 32, 157–174.
- Arias, M.C. & Sheppard, W.S. (1996). Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 557–566.
- Aronstein, K.A. & Murray, K.D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S20–S29. DOI:10.1016/j.jip.2009.06.018.
- Ash, C., Priest, F.G., and Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 64 (3): 253–260. DOI:10.1007/ BF00873085.
- Aucapiña, M. (2016). Eficacia del Clorpirifós para el control de Polilla de quinua (*Eurysacca melanocampta*) en cultivo de quinua-Choclococha-Pomacocha-Acobamba-HVCA. Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica. (Tesis de pregrado).
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L.P., Delbac, F. & Blot, N., (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2, 1–7. DOI:10.1038/srep00326
- Aumeier, P., Rosenkranz, P., Gonçalves, L.S. (2000). A comparison of the hygienic response of Africanized and European (*Apis mellifera carnica*) honey bees to *Varroa*-infested brood in tropical Brazil. *Genet Mol Biol.* 23(4):787–91.
- Avalos, J., Rosero, H., Maldonado, G. & Reynaldi, F.J. (2019). Honey bee louse (*Braula schmitzi*) as a honey bee virus vector?. *Journal of Apicultural Research*, DOI: 10.1080/00218839.2019.1565726
- Avise, J.C., Arnold, J. & Ball, R.M. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Aydin, L., Gulegen, E., Cakmaki, I., Girisgin, O.G. & Harrington, W. (2006). Relation between *Nosema* and Chalkbrood disease and its implication for an apiary management model. *Bull Vet Inst Pulawy* 50:471–475.
- Azpiazu, C., Bosch, J., Viñuela, E., Medrzycki, P., Teper, D. & Sgolastra, F. (2019). Chronic oral exposure to field-realistic pesticide combinations via pollen and nectar: effects on feeding and thermal performance in a solitary bee. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Bak, B. & Wilde, J. (2015). Grooming behavior by worker bees of various subspecies of honey bees to remove *Varroa destructor* mites. *Journal of Apicultural Research* 54, 207–15
- Bacandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Falcaro, C., Gallina, A. & Mutinelli, F. (2010). Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 335–340.

- Badawy, M.E.I., Nasr, H.M. & Rabea, E.I. (2015). Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. *Apidologie* 46, 177–193. DOI:10.1007/s13592-014-0315-0)
- Baer, B., Collins, J., Maalaps, K. & den Boer, S.P.A. (2016). Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Ecol. Evol.* 6, 2877–2885
- Bailey, L. & Ball, B.V. (1991). *Honey Bee Pathology*. London, UK: Academic Press.
- Bailey, L. & Collins, M.D. (1982). Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a New Genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* Nom. Rev.; Comb. Nov. *J. Appl. Bacteriol.* 53, 215–217.
- Bailey, L. & Woods, R.D. (1977). Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* 37, 175–182. DOI:10.1099/0022-1317-37-1-175
- Bailey, L. (1955). The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* (Zander). *Parasitology*, 45, 86–94.
- Bailey, L. (1956). Aetiology of European foulbrood; a disease of the larval honey-bee. *Nature*, 178, 1130. DOI:10.1038/1781130a0
- Bailey, L. (1957). The cause of European foulbrood. *Bee World*, 38, 85–89. DOI:10.1080/0005772X.1957.11094983
- Bailey, L. (1959). An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton*, and observations on its distribution and ecology. *Journal of Insect Pathology* 1: 80–85.
- Bailey, L. (1974). An unusual type of *Streptococcus pluton* from the eastern hive bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 23, 246–247. DOI:10.1016/0022-2011(74)90192-X
- Bailey, L. (1981). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London, UK, 124 pp.
- Bailey, L. (1983). *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 65–69. DOI:10.1111/j.1365-2672.1983.tb02648.x
- Bailey, L., Ball, B.V. & Perry, J. (1983). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology* 103: 13–20.
- Bailey, L., Ball, B.V. & Perry, J.N. (1983). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann Appl Biol.* 103(1):13–20. DOI:10.1111/j.1744-7348.1983.tb02735.x
- Bailey, L., Gibbs, A.J. & Woods, R.D. (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21(3):390–395. DOI:10.1016/0042-6822(63)90200-9
- Bailey, L., Gibbs, A.J. & Woods, R.D. (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virol.* 23(3):425–429. DOI:10.1016/0042-6822(64)90266-1
- Ball, B.V. & Bailey, L. (1997). Viruses, in: Morse RA and Flottum K (Ed.). *Honey bee pests, predators, and diseases*, A.I. Root Company, Medina, pp. 11–32
- Ball, B.V. (1988). The impact of secondary infections in honey-bee colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Africanized honey bees and bee mites* Ellis Horwood Ltd 457–461.
- Ball, B.V. (1999) Paralysis, in: Collin ME, Ball BV, and Kilani M (Ed.). *Bee disease diagnosis*, Options Méditerranéennes, pp. 81–89
- Bamrick, J.F. (1967). Resistance to American foulbrood in honey bees: VI. Spore germination in larvae of different ages. *Journal of Invertebrate Pathology* 9 (1): 30–34. DOI:10.1016/0022-2011(67)90039-0.
- Banks, N. C., Paini, D. R., Bayliss, K. L. & Hodda, M. (2015). The role of global trade and transport network topology in the human mediated dispersal of alien species. *Ecol. Lett.* 18, 188–199
- Barascou, L., et al. (2021). Pollen nutrition fosters honeybee tolerance to pesticides. *R. Soc. Open Sci.* 8: 210818. DOI:10.1098/rsos.210818

- Barchuk, A.R., Cristino, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simões, Z.L. & Maleszka, R. (2007). Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. BMC Dev Biol. 7:70. DOI:10.1186/1471-213X-7-70. PMID: 17577409; PMCID: PMC1929063.
- Barriga, G.P., Cifuentes-Munoz, N., Rivera, P.A., Gutierrez, M., Shmaryahu, A., Valenzuela, P.D. & Engel, E.A. (2012). First detection and complete genome sequence of Deformed wing virus in Chilean honeybees. Virus Genes 45, 606–609
- Barron, A.B. (2015). Death of the bee hive: understanding the failure of an insect society. Current Opinion in Insect Science 10:45-50.
- Bartomeus, I. & Dicks, L. V. (2019). The need for coordinated transdisciplinary research infrastructures for pollinator conservation and crop pollination resilience. Environmental Research Letters, 14(4), 045017.
- Bass, C. (2015). Desanholm the global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. Pestic Biochem Physiol, 121: 78–87. DOI:10.1016/j.pestbp.2015.04.004
- Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M. & Dietze, J.E. (2014). Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in US Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. J. Am. Water Resour. Assoc, 50, 275–290
- Beaurepaire, A. L. *et al.* (2015). Host specificity in the honeybee parasitic mite, *Varroa spp.* in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. PLoS One 10.
- Beaurepaire, A., Arredondo, D., Genchi García, M.L., Castelli, L., Reynaldi, F.J., Antúnez, K., Invernizzi, C., Mondet, F., Le Conte, Y. & Dalmon, A. (2022). Genetic diversification of an invasive honey bee ectoparasite across sympatric and allopatric host populations. Infection, Genetics and Evolution 103:105340. DOI:10.1016/j.meegid.2022.105340
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J.R. & Dalmon, A. (2020). Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. Insects 11(4):239. DOI:10.3390/insects11040239
- Beaurepaire, A.L., Krieger, K.J. & Moritz, F.A. (2017). Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricides resistance. Infection, Genetics and Evolution 50, 49-54. DOI:10.1016/j.meegid.2017.02.011
- Beaurepaire, A.L., Moro, A., Mondet, F., Le Conte, Y., Neumann, P. & Locke, B. (2019). Population genetics of ectoparasitic mites suggest arms race with honeybee hosts. Sci. Rep. 9, 1–9. DOI:10.1038/s41598-019-47801-5.
- Bekele, A.Z., Mor, S.K., Phelps, N.B.D., Goyal, S.M. & Armien, A.G. (2015). A Case Report of *Nosema ceranae* Infection in Honey Bees in Minnesota, USA. Vet. Q. 35, 48–50. DOI:10.1080/01652176.2014.981766
- Belloy, L., Imdorf, A., Fries, I., Forsgren, E., Berthoud, H., Kuhn, R. & Charrière, J.D. (2007). Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. Apidologie 38: 136–140. DOI:10.1051/apido:2006069.
- Belsky, J. & Joshi, N.K. (2020). Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on *Apis* and non-*Apis* bees in agricultural landscape. Front. Environ. Sci. 8, 81.
- Belzunces, L.P., Pelissier, C. & Lewis, G.B. (1999). Hazards of pesticides to bees. Avignon (France). 7th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group. Institut National de la Recherche Agronomique – INRA Editions. ISBN: 2-7380-0966-2.
- Benbrook, C.M. (2012). Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S.—the first sixteen years. Environ Sci Eur. Dec 1; 24(1):24.
- Benbrook, C.M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. Environ Sci Eur, 28(3). PMC5044953 DOI:10.1186/s12302-016-0070-0 PMID: 27752438
- Benzidane, Y., Touinsi, S., Motte, E., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Leduc, L. & Thany, S.H. (2010). Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. Pest Manag. Sci. 66. DOI:10.1002/ps.2022

- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H. & Nowotny, N. (2006). Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2414–2420.
- Berg, C.J., King, H.P., Delenstarr, G., Kumar, R., Rubio, F. & Glaze, T. (2018). Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. *PLoS One* 13, e0198876.
- Bergero, M., Bosco, L., Giacomelli, A., Angelozzi, G., Perugini, M. & Merola, C. (2021). Agrochemical contamination of honey and bee bread collected in the piedmont region, Italy. *Environment* 8 (7), 62.
- Beshers, S.N. & Fewell, J.H. (2001). Models of division of labor in social insects. *Annual review of entomology*, 46(1):413-440.
- Betti, M.I., Wahl, L.M. & Zamir, M. (2014). Effects of infection on honey bee population dynamics: A model. *PLoS ONE* 9, e110237.
- Bianconi, A., Zurita, J., Lopez, A., Brest, E., & Rojas, J. (2012). Zonificación RIAN, Chaco y Formosa. INTA.
- Biddinger, D.J., Robertson, J.L., Mullin, C., Frazier, J., Ashcraft, S.A., Rajotte, E.G., Joshi, N.K. & Vaughn, M. (2013). Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). *PLoS One*, 8(9), e72587. DOI:10.1371/journal.pone.0072587 PMID:24039783
- Bierzychudek, A. (1979). Historia de la Apicultura Argentina. H. J. Mattone, Buenos Aires, Argentina.
- Bigio, G., Al Toufaily, H., Hughes, W.O.H. & Ratnieks, F.L.W. (2014). The effect of one generation of controlled mating on the expression of hygienic behaviour in honey bees. *J. Apic. Res.* 53, 563–568.
- Bird, G., Wilson, A.E., Williams, G.R. & Hardy, N.B. (2021). Parasites and pesticides act antagonistically on honey bee health. *J. Appl. Ecol.* 58, 997–1005. DOI:10.1111/1365-2664.13811
- Bird, S. (2018). Organophosphate and carbamate poisoning. Uptodate, 17-9. Disponible en: <https://www-uptodatecom.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/contents/organophosphate-and-carbamatepoisoning/print?search=intoxicaci%C3%B3n%20por%25%E2%80%A6>.
- Blacquièrre, T. & Van der Steen, J.J. (2017). Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees? *Pest Manag. Sci.* 73, 1299e1304. DOI:10.1002/ps.4583.
- Blacquièrre, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A. & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992. DOI:10.1007/s10646-012-0863-x PMID:22350105
- Blake, R. (2018). EU Neonicotinoid Ban Removes Vital Tools in Global Fight Against Pests. *Outlooks Pest Manag.* 29(5), 197-200.
- Blanchard, P., Guillot, S., Antúnez, K., Köglberger, H., Kryger, P., de Miranda, J.R., Franco, S., Chauzat, M., Thiéry, R. & Ribière, M. (2014). Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *J. Virol. Methods* 197, 7–13.
- Blengino, C. (2014). Sector Apícola. Alimentos Argentinos. Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación. Buenos Aires, Argentina. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/otros/apicola/informes/2014> pd. Consultado 20 Feb, 2017.
- Bloch, G. *et al.* (2010). Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11240–11244
- Blot, N., Clémencet, J., Jourda, C., Lefevre, P., Warrit, N., Esnault, O. & Delatte, H. (2023). Geographic population structure of the honeybee microsporidian parasite *Vairimorpha* (*Nosema*) *ceranae* in the South West Indian Ocean. *Scientific Reports* 13:12122. DOI:10.1038/s41598-023-38905-0
- Blot, N., Vaillat, L., Rouzé, R. & Delatte, H. (2019). Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS ONE* 14, e0215466. DOI:10.1371/journal.pone.0215466 PMID:30990837

- Bodden, J.M., Hazlehurst, J.A., Wilson Rankin, E.E. & Rehan, S. (2019). Floral traits predict frequency of defecation on flowers by foraging bumble bees. *J. Invertebr. Pathol.* 19 (5), 1–3. DOI:10.1093/jisesa/iez091.
- Boecking, O. & Genersch, E. (2008). Varroosis—The Ongoing Crisis in Bee Keeping. *J. Verbr. Lebensm.* 3, 221–228.
- Bohan, D.A., Boffey, C.W., Brooks, D.R., Clark, S.J., Dewar, A.M., Firbank, L.G., Haughton, A.J., Hawes, C., Heard, M.S., May, M.J., *et al.* (2005). Effects on weed and invertebrate abundance and diversity of herbicide management in genetically modified herbicide-tolerant winter-sown oilseed rape. *Proc. R. Soc. B Boil. Sci.* 272, 463–474.
- Bojko, J. & Stentiford, G.D. (2022a). Microsporidian pathogens of aquatic animals. In *Microsporidia: Current Advances in Biology* (Reinke, A.W. and Weiss, L., eds), pp. 247–284, Springer
- Bojko, J., Reinke, A.W., Stentiford, G.D., Williams, B., Rogers, M.S.J. & Bass, D. (2022b). Microsporidia: a new taxonomic, evolutionary, and ecological synthesis. *Trends in Parasitology*. DOI:10.1016/j.pt.2022.05.007
- Boncristiani, H., Ellis, J.D., Bustamante, T., Graham, J., Kimmel, C.B., Mortensen, A. & Schmehl, D.R. (2021). World Honey Bee Health: The Global Distribution of Western Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Pests and Pathogens. *Bee World*. 98:1 2–6
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., *et al.* (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67. DOI:10.1007/s11356-014-3332-7
- Bonmatin, J.-M., Marchand, P., Cotte, J.-F., Aajoud, A., Casabianca, H., Goutailler, G., *et al.* (2007). Bees and systemic insecticides (imidacloprid, fipronil) in pollen: subnano-quantification by HPLC/MS/MS and GC/MS, in *Environmental Fate and Ecological Effects of Pesticide*, eds A.A.M. Del Re, E. Capri & T.M. Fragoulis (Pavia: La Goliardica Pavese), 827.
- Bordin, F., Zulian, L., Granato, A., Caldon, M., Colamonico, R., Toson, M., Trevisan, L., Biasion, L., Mutinelli, F. (2022). Presence of Known and Emerging Honey Bee Pathogens in Apiaries of Veneto Region (Northeast of Italy) during Spring 2020 and 2021. *Appl. Sci.* 12, 2134. DOI:10.3390/app12042134
- Borum, A.E. & Ulgen, M. (2008). Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) infection and fungal agents of honeybees in north-west Turkey. *J. Apic Res.* 47:170–171.
- Botías, C., Anderson, D.L., Meana, A., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R. & Higes, M. (2012). Further Evidence of an Oriental Origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *J. Invert. Pathol.* 110, 108–113
- Botías, C., David, A., Horwood, J., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Hill, E., *et al.* (2015). Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. *Environ. Sci. Technol.* 49, 12731–12740. DOI: 10.1021/acs.est.5b03459
- Botias, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., GarridoBailón, E., Nanetti, A., Meana, A. & Higes, M. (2012a). *Nosema spp.* parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honeybee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ. Microbiol. Rep.* DOI:10.1111/j.1758-2229.2011.00299.x.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A. & Higes, M. (2013). *Nosema spp.* Infection and its Negative Effects on Honey Bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the Colony Level. *Vet. Res.* 44, 1–15. DOI: 10.1186/1297-9716-44-25
- Bouga, M., Alaux, C., Bienkowska, M., Büchler, R., Carreck, N.L., Cauia, E. & Wilde, J. (2011). A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *J. Apicult. Res.* 50 (1), 51–84. DOI:10.3896/IBRA.1.50.1.06.
- Bouga, M., Harizan, P.C., Kiliadis, G. & Alahiotis, S. (2005). Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR–RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*, 36, 335–344.
- Boulmier, T., Kada, S., Ponchon, A., Dupraz, M., Dietrich, M., Gamble, A., Bourret, V., Duriez, O., Bazire, R., Tornos, J., Tveraa, T., Chambert, T., Garnier, R., McCoy, K.D. (2016). Migration, prospecting, dispersal? What host movement matters for infectious agent circulation? *Integr. Comp. Biol.* 56, 330–342. DOI:10.1093/icb/ icw015.
- Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J. & Gunn, A. (1999). The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 101–106.

- Branchiccela, B., Aguirre, C., Parra, G., Estay, P., Zunino, P. & Antunez, K. (2014). Genetic changes in *Apis mellifera* after 40 year of Africanization. *Apidologie*, 45(6), 752–756. DOI:10.1007/s13592-014-0293-2
- Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C., Martinez de la Escalera, G., Mendoza, Y., Santos, E., Silva, C., Zunino, P. & Antunez, K. (2019). Impact of nutrition stress on the honeybee colony health. *Sci. Report.* 9 : 10156. DOI:10.1038/s41598-019-46453-9.
- Brandon, H. & Robinson, E. (2015). *Delta Agricultural Digest*. Farm Press, Clarksdale, MS.
- Brandt, A. *et al.* (2017). Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. *Sci. Rep.* 7, 4673
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M. & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47. DOI:10.1016/j.jinsphys.2016.01.001
- Brasacco, C., Quintana, S., Di Gerónimo, V., Genchi Garcia, M.L., Sguazza, G.H., Bravi, M.E., Fagnoli, L., Reynaldi, F.J., Eguaras, M. & Maggi, M. (2020). Deformed wing virus type a and b in managed honeybee colonies of Argentina. *Bull Entomol Res.* DOI:10.1017/S000748532000036X
- Brasacco, C., Silvina, S., Negri, P., Medici, S., Ruffinengo, S., Eguaras, M. & Maggi, M. (2013). Detección mediante PCR en tiempo Real de tres virus patógenos de *Apis mellifera* en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. VIII Encuentro Biólogos en Red. Mar del Plata, Argentina
- Bravi, M.E., Álvarez, L.J., Lucía, M., Pecoraro, M.R.I., Genchi García, M.L. & Reynaldi, F.J. (2019). Wild bumble bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) as a potential reservoir for bee pathogens in northeastern Argentina. *Journal of Apicultural Research* 58(5):710-713. DOI:10.1080/00218839.2019.1655183.
- Bravi, M.E., Avalos, J., Rosero, H., Maldonado, G., Reynaldi, F.J., & Genchi-García M.L. (2020). Comunicación breve: Detección molecular de virus de abejas en Ecuador. *Revista Española de Investigación Agraria*, 18 (1), e05SC02. <https://doi.org/10.5424/sjar/2020181-15779>
- Bravo, J., Carbonell, V., Valdebenito, J.T., Figueroa, C., Valdovinos, C.E., Martín-Hernández, R., *et al.* (2014). Identification of *Nosema ceranae* in the Valparaíso District, Chile. *Arch. Med. Vet.* 46, 487–491. DOI:10.4067/S0301-732X2014000300021
- Breed, M.D., Guzmán-Novoa, E. & Hunt, G.J. (2004). Defensive behavior of honey bees: Organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annual Review of Entomology*, 49, 271–278. DOI:10.1146/annurev.ento.49.061802.123155
- Brettell, L.E., Mordecai, G.J., Schroeder, D.C., Jones, I.M., da Silva, J.R., Vicente-Rubiano M., Martin, S.J. (2017). A comparison of deformed wing virus in deformed and asymptomatic honey bees. *Insects* 8(1):28. DOI:10.3390/insects8010028
- Britton, N.F. & Jane White, K.A. (2021). The effect of covert and overt infections on disease dynamics in honey-bee colonies. *Bulletin of Mathematical Biology* 83, 67.
- Broadrup, R.L., Mayack, C., Schick, S.J., Eppley, E.J., White, H.K. & Macherone, A. (2019). Honey bee (*Apis mellifera*) exposomes and dysregulated metabolic pathways associated with *Nosema ceranae* infection. *PloS One* 14, e0213249.
- Brodtschneider, R. & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. 41: 278-294. DOI:10.1051/apido/2010012
- Brodtschneider, R., Gray, A., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Dahle, B., de Graaf, D. C., Maja Drazic, M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., GrzeRda, U., Hetzroni, A., Kauko, L., Kristiansen, P., *et al.* (2018). Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research*, 57(3), 452–457. DOI:10.1080/00218839.2018.1460911
- Brødsgaard, C.J., Ritter, W. & Hansen, H. (1998). Response of in Vitro Reared Honey Bee Larvae to Various Doses of *Paenibacillus larvae larvae* Spores. *Apidologie* 29, 569–578.

- Bruckner, S., Straub, L., Neumann, P. & Williams, G.R. (2021). Synergistic and Antagonistic Interactions Between *Varroa destructor* Mites and Neonicotinoid Insecticides in Male *Apis mellifera* Honey Bees. *Front. Ecol. Evol.* 9:756027. DOI:10.3389/fevo.2021.756027
- Brutscher, L.M., McMenamin, A.J. & Flenniken, M.L. (2016). The Buzz about honey bee viruses. *PLoS Pathogens*, 12: e1005757. DOI:10.1371/journal.ppat.1005757
- Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Klaudiny, J. & Majtan, J. (2014). Honeybee glucose oxidase—Its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂ -mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften* 101, 661–670.
- Büchler, R., Berg, S. & Le Conte, Y. (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* 41, 393–408. DOI:10.1051/apido/2010011.
- Büchler, R., Costa, C., Hatjina, F., Andonov, S., Meixner Marina, D., Le Conte, Y., *et al.* (2014). The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 205–214. DOI:10.3896/IBRA.1.53.2.03
- Büchler, R., Kovacic, M., Buchegger, M., Puskadija, Z., Hoppe, A. & Brascamp, E.W. (2020). Evaluation of traits for the selection of *Apis mellifera* against *Varroa destructor*. *Insects* 11, 618.
- Buchmann, S. & Nabhan, G. (1996). *The Forgotten Pollinators*. Island Press, Washington.
- Buchmann, S.L. (1982). Africanized Bee Confirmed in Panama. *American Bee Journal* 122(5): 322.
- Budge, G.E., Shirley, M.D., Jones, B., Quill, E., Tomkies, V., Feil, E.J., Brown, M.A. & Haynes, E.G. (2014). Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *Isme J.* 8: 1588–1597.
- Budge, G.E., Barrett, B., Jones, B., Pietravalle, S., Marris, G., Chantawannakul, P., Thwaites, R., Hall, J., Cuthbertson, A.G. & Brown, M.A. (2010). The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *Journal of Invertebrate Pathology* 105: 164–170. DOI:10.1016/j.jip.2010.06.004
- Burnham, P.A. *et al.* (2021). Flowers as dirty doorknobs: Deformed wing virus transmitted between *Apis mellifera* and *Bombus impatiens* through shared flowers. *J. Appl. Ecol.* DOI:10.1111/1365-2664.13962
- Byatt, M.A., Chapman, N.C., Latty, T. & Oldroyd, B.P. (2016). The genetic consequences of the anthropogenic movement of social bees. *Insectes Sociaux*, 63(1):15-24. DOI: 10.1007/S00040-015-0441-3
- Çakmak, I. & Sevençakmak, S. (2016). Beekeeping and recent colony losses in Turkey. *Uludag Bee Journal* 16, 31–48.
- Calderón, A. (2017). Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) del Malatión y Clorpirifós-etil en organismos de *Capitella cf. capitata* de la bahía de Chetumal. Universidad de Quintana Roo, México. (Tesis de pregrado).
- Calderón, R.A., Van Veen, J.W., Sommeijer, M.J. & Sánchez, L.A. (2010). Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.* 50, 281–297.
- Calfee, E., Agra, M.N., Palacio, M.A., Ramírez, S.R., & Coop, G. (2020). Selection and hybridization shaped the rapid spread of African honey bee ancestry in the Americas. *PLOS Genetics*, 16 (10), e1009038. DOI:10.1371/journal.pgen.1009038
- Calis, J.N.M., Fries, I. & Ryrie, S.C. (1999). Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30, 111–124. DOI:10.1051/apido:19990203.
- Camazine, S. (1986). Differential reproduction of the mite, *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae), on Africanized and European honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, 801–803.
- Campana, C., Peralta, C., Cecconello, J. C., Pons, D. H., Uranga, J., Scavuzzo, M. C., & Ferral, A. (2019). Geospatial tools applied to the generation of an aptitude map for the development of beekeeping activity in San Javier, Córdoba, Argentina. In 2019 XVIII Workshop on Information Processing and Control (RPIC) (pp. 298-302). IEEE.

- Cánovas, F., De La Rúa, P., Serrano, J. & Galián, J. (2008). Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 46:24-30. DOI:10.1111/j.1439-0469.2007.00435.x
- Cantwell, G.E. (1970). Standard methods for counting Nosema spores. *American Bee Journal*, 110: 222-223.
- Carneiro, F.E., Torres, R.R., Strapazzon, R., *et al.* (2007). Changes in the reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson e Trueman) in africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in southern Brazil. *Neotrop Entomol* 36:949–952. DOI:10.1590/S1519-566X2 007000600018
- Caron, D.M. (2001). Africanized honey bees in the Americas (228 pp.). Medina, OH: The A. I. Root Co.
- Carpenter, M.H. & Harpur, B.A. (2021). Genetic past, present, and future of the honey bee (*Apis mellifera*) in the United States of America. *Apidologie*. DOI:10.1007/s13592-020-00836-4
- Carr, S.M. (2023). Multiple mitogenomes indicate Things Fall Apart with Out of Africa or Asia hypotheses for the phylogeographic evolution of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports* 13:9386. DOI:10.1038/s41598-023-35937-4
- Carreck, N. & Neumann, P. (2010). Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49 (1), 1–6
- Carreck, N.L. (2017). A beekeeper's perspective on the neonicotinoid ban. *Pest Manag. Sci.* 73, 1295e1298. DOI:10.1002/ps.4489.
- Carreck, N.L., Ratnieks, F.L.W. (2014). The dose makes the poison: have “field realistic” rates of exposure of bees to neonicotinoid insecticides been overestimated in laboratory studies? *J. Apicult. Res.* 53, 607e614. DOI:10.3896/IBRA.1.53.5.08
- Carrillo-Tripp, J. *et al.* (2016). In vivo and in vitro infection dynamics of honey bee viruses. *Sci. Rep.* 6, 22265.
- Casanova, O. (2000). Evolución del comportamiento grooming contra *Varroa jacobsoni* (Acari: Dermanicidae) en abejas africanizadas (Hymenoptera: Apidae) en el estado Táchira, Venezuela. *Revista Científica UNET*, 12(1), 1–10.
- Casida, J.E. (2011). Neonicotinoid Metabolism: Compounds, Substituents, Pathways, Enzymes, Organisms, and Relevance. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2923–2931. DOI:10.1021/jf102438c
- Castelli, L., Balbuena, S., Branchiccela, B., Zunino, P., Liberti, J., Engel, P. & Antúnez, K. (2021). Impact of Chronic Exposure to Sublethal Doses of Glyphosate on Honey Bee Immunity, Gut Microbiota and Infection by Pathogens. *Microorganisms* 9, 845. DOI:10.3390/microorganisms9040845
- Castelli, L., Branchiccela, B., Garrido, M., Invernizzi, C., Porrini, M., Romero, H., Santos, E., Zunino, P. & Antúnez, K. (2020). Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microb. Ecol.* 80, 908–919.
- Castelli, L., Genchi García, M.L., Dalmon, A., Arredondo, D., Antúnez, K., Invernizzi, C., Reynaldi, F.J., Le Conte, Y. & Beaurepaire, A. (2021). Intra-Colonial Viral Infections in Western Honey Bees (*Apis Mellifera*). *Microorganisms* 9, 1087. DOI:10.3390/microorganisms9051087
- Castilla, R., Reynaldi F., Sguazza G., Pecoraro M. & Galosi C. (2015). Determinación de virus que afectan a las abejas durante el período 2009-2014. XXXV Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Virología.
- Catchot, A., Allen, C., Cook, D., Dodds, D., Gore, J., Irby, T., *et al.* (2016). Insect control guide for agronomic crops. Insect Control Guide Committee, Mississippi State University Extension Service Publication.
- CEB. (2011). Methode n°230: Method for the evaluation of side-effects of plant protection products on honey bees (*Apis mellifera* L.). Association Française de Protection des Plantes. 43pp.
- Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., *et al.* (2008). Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Research* 133: 280–284.
- Chagas, D., Monteiro, F., Hubner, S., Lima, M., & Fischer, G. (2019). Viruses that affect *Apis mellifera* and their occurrence in Brazil. *Ciência Rural*. 49. <https://doi.org/10.1590/01038478cr20181042>.

- Chagas, D.B., Monteiro, F.L., Barcelos, L.D.S., Frühauf, M.I., Ribeiro, L.C., Lima, M.D., Hübner, S.D.O. & Fischer, G. (2021). Black queen cell virus and *Nosema ceranae* coinfection in Africanized honey bees from southern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 40, 892–897.
- Chaimanee, V., Chen, Y., Pettis, J.S., Cornman, R.S. & Chantawannakul, P. (2011). Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *J. Invertebr. Pathol.* 107, 229–233.
- Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C. & Pettis, J.S. (2016). Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology* 89, 1–8.
- Chamkasem, N. & Vargo, J.D. (2017). Development and independent laboratory validation of an analytical method for the direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Reg. Sci.* 5, 1–9.
- Chantawannakul, P., de Guzman, L.I., Li, J. & Williams, G.R. (2016). Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. *Apidologie* 47, 301–324. DOI:10.1007/s13592-015-0407-5
- Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N. & Brown, M. (2006). A Scientific Note on the Detection of Honeybee Viruses Using Real-Time PCR (TaqMan) in *Varroa Mites* Collected from a Thai Honeybee (*Apis mellifera*) Apiary. *J. Invert. Pathol.* 91, 69–73.
- Chapman, N. C. *et al.* (2016). Hybrid origins of Australian honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 47, 26–34.
- Chauvet, M. *et al.* (2022). Temporal variations of Microsporidia diversity and discovery of new host-parasite interactions in a lake ecosystem. *Environ. Microbiol.* 24, 1672–1686
- Chauzat, M.P., Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., Cougoule, N., & Faucon, J.P. (2007). Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research*, 46: 127–128.
- Chaves Guevara, G., Cordero-Solórzano, J. M., Cubero Murillo, A., & León, B. (2024). Prevalence of seven viruses in Africanized honey bees in Costa Rica. *Journal of Apicultural Research* 63(2), 220–227. DOI:10.1080/00218839.2022.2109376
- Chávez-Galarza, J., Garnery, L., Henriques, D., Neves, C. J., Loucif-Ayad, W., Jonhston, J. S., & Pinto, A. (2017). Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: further insights from a large-scale study using sequence data of the tRNA^{Leu-cox2} intergenic region. *Apidologie*, 48(4), 533–544. DOI:10.1007/s13592-017-0498-2
- Chemurot, M., De Smet, L., Brunain, M., De Rycke, R. & de Graaf, D.C. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *Eur. J. Protistol.* 61, 13–19, doi:10.1016/j.ejop.2017.07.002.
- Chen, C., Liu, Z., Pan, Q., Chen, X., Wang, H., Guo, H., *et al.* (2016). Genomic analyses reveal demographic history and temperate adaptation of the newly discovered honey bee subspecies *Apis mellifera sinisxinyuan* n. ssp. *Molecular biology and evolution*, 33(5), 1337–1348.
- Chen, Y., Evans, J. & Feldlaufer, M. (2006a). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 92, 152–159.
- Chen, Y., Evans, J., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen Rindal, D. & Pettis, J. (2009a). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the european honey bee, *Apis mellifera*. *J Eukaryot Microbiol* 56, 142–147.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B. & Pettis, J.S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97, 186–188. DOI:10.1016/j.jip.2007.07.010
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M. & Pettis, J.S. (2009b). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 101, 204–209. DOI:10.1016/j.jip.2009.05.012

- Chen, Y., Pettis, J.S., Evans, J.D., Kramer, M. & Feldlaufer, M.F. (2004). Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 35: 441–448.
- Chen, Y.P. & Siede, R. (2007). Honey bee viruses. *Adv Virus Res.* 70: 33–80. DOI:10.1016/S0065-3527(07)70002-7
- Chen, Y.P., Higgins, J.A. & Feldlaufer, M.F. (2005). Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 71: 436–441.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Collins, A. & Feldlaufer, M.F. (2006b). Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 606–611.
- Chen, Y.W., Chung, W.P., Wang, C.H., Solter, L.F. & Huang, W.F. (2012). *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperatura. *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 111, Issue 3. ISSN 0022-2011. DOI:10.1016/j.jip.2012.08.014.
- Cheng, X., Zhang, L., Luo, J., Yang, S., Deng, Y., Li J. & Hou, C. (2022). Two Pathogenic Fungi Isolated From Chalkbrood Samples and Honey Bee Viruses They Carried. *Front. Microbiol.* 13:843842. DOI: 10.3389/fmicb.2022.843842
- Cheruiyot, S.K., Lattorff, H.M.G., Kahuthia-Gathu, R., Mbugi, J.P. & Muli, E. (2018). Varroa specific hygienic behavior of *Apis mellifera scutellata* in Kenya. *Apidologie*. 49:439–49. DOI:10.1007/s13592-018-0570-6
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G.J., Siuda, M., Bałk, B., Judycka, S., *et al.* (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie* 48,211–222. DOI:10.1007/s13592-016-0466-2
- Clark, T.B. (1978). A filamentous virus of the honey bee. *J Invertebr Pathol* 32(3):332–340. DOI:10.1016/0022-2011(78)90197-0
- Clarke, D.D. (1986). Tolerance of parasites and disease in plants and its significance in host-parasite interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 810.
- Clarke, K.E., Oldroyd, B.P., Javier, J., Quezada-Euan, G. & Rinderer, T.E. (2001). Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatán peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*, 10(6), 1347-1355. DOI:10.1046/j.1365-294X.2001.01274.x
- Clarke, K.E., Rinderer, T.E., Franck, P., Quezada-Euán, J.G. & Oldroyd, B.P. (2002). The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: A study of a massive hybridization event across time. *Evolution*, 56, 1462–1474. DOI:10.1554/0014-3820
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., *et al.* (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15, 615–636. DOI:10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x
- Clermont, A., Eickermann, M., Kraus, F., Georges, C., Hoffmann, L. & Beyer, M. (2014). A survey on some factors potentially affecting losses of managed honey bee colonies in Luxembourg over the winters 2010/2011 and 2011/2012, *Journal of Apicultural Research*, 53:1, 43-56, DOI: 10.3896/IBRA.1.53.1.04
- Cocca, C., Ventura, C., Nunez, M., Randi, A. & Venturino, A. (2015). El organofosforado Clorpirifós como disruptor estrogénico y factor de riesgo para el cáncer de mama. *Acta toxicológica argentina*, 23(3), 142-152
- CODEX Alimentarius. (2013). Pesticide residues in food and feed: Glyphosate. Food and Agriculture Organization and World Health Organization. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>. (Acceso: Julio 2022)
- Collet, T.; Ferreira, K.M., Arias, M.C., Soares, A.E.E. & Del Lama, M.A. (2006). Genetic structure of Africanized honey bee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. *Heredity*, 97(5), 329-335. DOI:10.1038/sj.hdy.6800875
- Comisión europea. (2013). COMMISSION REGULATION (EU) No 293/2013 of 20 March 2013 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for emamectin benzoate, etofenprox, etoxazole, flutriafol, glyphosate, phosmet, pyraclostrobin, spinosad and spirotetramat

- in or on certain products. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0293&from=EN>. (Acceso: Agosto 2022).
- Comisión europea. (2020). Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. SANTE/12682/2019. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf. (Acceso: Junio 2022).
- Cook, S.C. (2019). Compound and dose-dependent effects of two neonicotinoid pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) metabolic physiology. *Insects* 10:18. DOI:10.3390/insects10010018
- Copley, T.R. & Jabaji, S.H. (2011). Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology* 112, 15–24. DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05192.x
- Copley, T.R., Chen, H., Giovenazzo, P., Houle, E., & Jabaji, S.H. (2012). Prevalence and seasonality of *Nosema* species in Québec honey bees. *The Canadian Entomologist*, 144(4), 577–588. DOI:10.4039/tce.2012.46
- Cornejo, G. & Rossi, C. (1975). Enfermedades de las abejas, su profilaxis y prevención. 2ª ed. Hemisferio Sur. Argentina. 238 p.
- Cornelissen, B., Neumann, P. & Schweiger, O. (2019). Global warming promotes biological invasion of a honey bee pest. *Global Change Biology* 25, 3642–55
- Cornman, R.S., Tarpy, D.R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J.S. & Evans, J.D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS one*, 7(8), e43562.
- Cornuet, J.M. & Garnery, L. (1991). Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*. 22:627-642. DOI:10.1051/apido:19910606
- Cornuet, J.M., Garnery, L. & Solignac, M. (1991). Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*, 128(2), 393-403.
- Corradi, N. & Selman, M. (2013). Latest Progress in Microsporidian Genome Research. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 309–312.
- Corrêa-Marques, M.H. & De Jong, D. (1998). Uncapping of worker bee brood, a component of the hygienic behavior of Africanized honey bees against the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Apidologie*. 29:283–9.
- Corrêa-Marques, M.H., Medina, L.M., Martin, S.J. & De Jong, D. (2003). Comparing data on the reproduction of *Varroa destructor*. *Genet Mol Res* 2(1):1–6.
- Côté, I.M., Darling, E.S. & Brown, C.J. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283:9. DOI:10.1098/rspb.2015.2592
- Coulon, M. (2017). Rôle des interactions virus/pesticides dans le déclin des abeilles. Sciences agricoles. Université d'Avignon. Tesis.
- Coulon, M., Dalmon, A., Di Prisco, G., Prado, A., Arban, F., Dubois, E., Ribière-Chabert, M., Alaux, C., Thiéry, R. & Le Conte, Y. (2020). Interactions Between Thiamethoxam and Deformed Wing Virus Can Drastically Impair Flight Behavior of Honey Bees. *Front. Microbiol.* 11:766. DOI:10.3389/fmicb.2020.00766
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Brieseman, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S. & Lipkin, W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(5848):283–287. DOI:10.1126/science.1146498
- Crailsheim, K. & Stolberg, E. (1989). Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal Insect Physiology* 35 (8): 595 – 602. DOI:10.1016/0022-1910(89)90121-2
- Cremer, S., Armitage, S.A.O. & Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Curr Biol* 17:693–702. DOI:10.1016/j.cub.2007.06.008

- Cresswell, J.E., Desneux, N. & van Engelsdorp, D. (2012). Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Manag Sci.* 68: 819–827. DOI:10.1002/ps.3290 PMID: 22488890
- Crewe, R.M., Hepburn, H.R. & Moritz, R.F.A. (1994). Morphometric analysis of two southern African races of honeybee. *Apidologie* 25, 61–70.
- Cridland, J.M., Tsutsui, N.D. & Ramírez, S.R. (2017). The Complex Demographic History and Evolutionary Origin of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Genome Biol. Evol.* 9(2):457–472. DOI:10.1093/gbe/evx009
- Criscione, C.D., Poulin, R., Blouin, M.S. (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol.* DOI:10.1111/j.1365-294X.2005.02587.x.
- Crozier, R., Crozier, Y. & Mackinlay, A. (1989). The COI and COII region of honeybee mitochondrial DNA: Evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Mol. Biol. Evol.* 6(4): 399–411.
- Crozier, R.H. & Crozier, Y.C. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133(1), 97–117.
- Crozier, Y.C., Koulianos, S. & Crozier, R.H. (1991). An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. *Experientia*, 47(9), 968–969. DOI:10.1007/BF01929894
- Csáki, T., Heltai, M., Markolt, F., Kovács, B., Békési, L., Ladányi, M., Péntek-Zakar, E., Meana, A., Botías, C., Martín-Henández, R., et al. (2015). Permanent prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Hungary. *Acta Vet. Hung.*, 63, 358–369, DOI:10.1556/004.2015.034.
- Cuhra, M., (2015). Review of GMO safety assessment studies: glyphosate residues in Roundup Ready crops is an ignored issue. *Environ. Sci. Eur.* 27, 20.
- Cuhra, M., Bøhn, T. & Cuhra, P. (2016). Glyphosate: too much of a good thing? *Front. Environ. Sci.* 4, 28.
- Currie, R.W., Pernal, S.F. & Guzmán-Novoa, E. (2010). Honey Bee Colony Losses in Canada. *J. Apic. Res.* 49, 104–106.
- Cutler, G.C. & Rix, R.R. (2015). Can poisons stimulate bees? Appreciating the potential of hormesis in bee–pesticide research. *Pest Manag. Sci.* 71, 1368–1370. DOI:10.1002/ps.4042
- Cutler, G.C. (2012). Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose Response* 11, 154–177. DOI:10.2203/dose response.12-008.
- Dahle, B. (2010). The Role of *Varroa destructor* for Honey Bee Colony Losses in Norway. *J. Apic. Res.* 49, 124–125.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L. & Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* 7(2):e32151. DOI:10.1371/journal.pone.0032151
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J. & Moury, B. (2017). Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Sci Rep* 7: 41045. DOI:10.1038/srep41045
- Dalmon, A., Diévert, V., Thomasson, M., Fouque, R., Vaissière, B.E., Guilbaud, L., Le Conte, Y. & Henry, M. (2021). Possible spillover of pathogens between bee communities foraging on the same floral resource. *Insects* 12(2):122. DOI:10.3390/insects12020122.
- Dancer, B.N. & Chantawannakul, P. (1997). The proteases of American foulbrood scales. *Journal of Invertebrate Pathology* 70 (2): 79–87. DOI:10.1006/jipa.1997.4672.
- Danka, R.G., Harris, J.W. & Dodds, G.E. (2016). Selection of VSH-derived “Pol-line” honey bees and evaluation of their *Varroa*-resistance characteristics. *Apidologie* 47, 483–490.
- Danka, R.G., Hellmich, R.L.I. & Rinderer, T.E. (1992). Nest usurpation, supersedure and colony failure contribute to Africanization of commercially managed European honey bees in Venezuela. *Journal of Apicultural Research.* 31: 119–123.

- Danka, R.G., Rinderer, T.E., Hellmich, R.I. & Collins, A.M. (1986). Comparative toxicities of four topically applied insecticides to Africanized and European honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 79, 18–21.
- DaPalma, T., Doonan, B.P., Trager, N.M. & Kasman, L.M. (2010). A systematic approach to virus–virus interactions. *Virus Research* 149: 1–9.
- Daughenbaugh, K.F., Martin, M., Brutscher, L.M., Cavigli, I., Garcia, E., Lavin, M. & Flenniken, M.L. (2015). Honey bee infecting lake sinai viruses. *Viruses*. 7(6):3285–3309. DOI:10.3390/v7062 772
- Davidson, E.W. (1970). Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 15 (3): 451–454. DOI:10.1016/0022-2011(70)90190-4.
- Dávila, N.M.F., Ortiz Menendo, S. & De Huiza, I.R. (1980). Presencia de la abeja africanizada en el Perú. *Revista Peruana de Entomología*, 23(1), 125–127.
- De Graaf, D.C. *et al.* (2001). Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie* 32 (6): 587–599. DOI:10.1051/apido:2001146.
- De Grandi-Hoffman, G., Ahumada, F., Zazueta, V., Chambers, M., Hidalgo, G. & Watkins deJong, E. (2016). Population growth of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee colonies is affected by the number of foragers with mites. *Exp. Appl. Acarol.*, 69, 21–34.
- De Grandi-Hofman, G., Chen, Y. & Simonds, R. (2013). The effects of pesticides on 543 queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 4(1):71–89. DOI:10.3390/insects4010071
- de Guzman, L., Rinderer, T.E., & Frake, A. (2007). Growth of *Varroa destructor* populations in Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Annals of the Entomological Society of America*, 100, 187–195 DOI:10.1603/00138746(2007)100[187:GOVDAV]2.0.CO;2
- de Guzman, L.I., Rinderer, T.E. & Stelzer, J.A. (1999). Occurrence of two genotypes of *Varroa jacobsoni* Oud. in North America. *Apidologie*, 30, 31–36.
- de Jong, D., Morse, R.A. & Eickwort, G.C. (1982). Mite pests of honey bees. *Annu. Rev. Entomol.* 27, 229–252. DOI:10.1146/annurev.en.27.010182.001305.
- De Jongh, E.J., Harper, S.L., Yamamoto, S.S. *et al.* (2022). One Health, One Hive: A scoping review of honey bees, climate change, pollutants, and antimicrobial resistance. *PLoS ONE* 17, e0242393.
- De la Cruz, E., Bravo, V. & Ramírez, F. (2010). Manual de plaguicidas de Centroamérica. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional. Costa Rica.
- de la Mora, A., Emsen, B., Morfín, N., Borges, D., Eccles, L., Kelly, P.G., Goodwin, P.H., & Guzmán Novoa, E. (2020). Selective breeding for low and high *Varroa destructor* growth in honey bee (*Apis mellifera*) colonies: initial results of two generations. *Insects*, 11(12), 864. DOI:10.3390/insects111208
- De la Mora, A., Morfin, N., Tapia-Rivera, J.C., Macías-Macías, J.O., Tapia-González, J.M., Contreras-Escareño, F., Petukhova, T. & Guzman-Novoa, E. (2023). The Fungus *Nosema ceranae* and a Sublethal Dose of the Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam Differentially Affected the Health and Immunity of Africanized Honey Bees. *Microorganisms* 11, 1258. DOI:10.3390/microorganisms11051258
- De la Rúa, P. *et al.* (2013). Conserving genetic diversity in the honeybee: Comments on Harpur *et al.* (2012). *Mol. Ecol.* 22, 3208–3210
- De la Rúa, P., Hernandez-Garcia, R., Jimenez, Y., Galian, J. & Serrano, J. (2005). Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from north-eastern Spain assessed by mitochondrial analysis. *Insect Systematics and Evolution*. 36: 21–28.
- De La Rúa, P., Jaffe, R., Dall’olio, R., Muñoz, I. & Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honey bees. *Apidologie* 40: 263–284.

- De la Rúa, P., Martínez, J., Domingo, O., & Gabaldón, I. (2013). Caracterización molecular de la biodiversidad de la cabaña apícola de la provincia de Albacete. *Revista de Estudios Albacetenses*, (9), 175-196.
- De la Rúa, P., Serrano, J. & Galián, J. (1998). Mitochondrial DNA variability in the Canary Island honeybees (*Apis mellifera* L.). *Molecular Ecology* 7: 1543-1548.
- De La Sota, M.D. y Bacci, M. (2005). Enfermedades de las abejas: Manual de Procedimientos. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Dirección Nacional de Sanidad Animal, Buenos Aires, Argentina. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/manual_enfermedades_abejas_senasa_abril2020.pdf
- De León-Door, A.P., Pérez-Ordóñez, G., Romo-Chacón, A., *et al.* (2020). Pathogenesis, epidemiology and variants of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood. *Journal of Apicultural Science* 64, 173–88
- De Marco, R. & Farina, W.M. (2001). Changes in food source profitability affect the trophallactic and dance behavior of forager honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50: 441-449.
- de Meeûs, T., McCoy, K.D., Prugnotte, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., Renaud, F. (2007). Population genetics and molecular epidemiology or how to “d’ébusquer la bête.”. *Infect. Genet. Evol.* 7, 308–332. DOI:10.1016/j.meegid.2006.07.003.
- de Miranda, J.R. & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: (Suppl. 1), S48–S61
- de Miranda, J.R., Cordoní, G. & Budge, G. (2010). The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S30–S47.
- de Santis, L. & Cornejo, L.G. (1968). La abeja africana en America del Sur. *Revista de la Facultad de Agronomía—Universidad Nacional La Plata* 44(1): 17-35.
- Dean, P. *et al.* (2016). Microsporidia: why make nucleotides if you can steal them? *PLoS Pathog.* 12, e1005870
- Dean, P. *et al.* (2018). Transporter gene acquisition and innovation in the evolution of Microsporidia intracellular parasites. *Nat. Commun.* 9, 1–12
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M. & Pham-Delègue, M.-H. (2004). Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Safety*; 57:410–419. DOI:10.1016/j.ecoenv.2003.08.001
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Menach, K.L., Budzinski, H., Cluzeau, S. & Pham-Delègue, M.H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 242–250.
- Delaplane, K.S. & Hood, W.M. (1999). Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud in the southeastern USA. *Apidologie* 30: 383–395.
- Delaplane, K.S., Berry, J.A., Skinner, J.A., Parkman, J.P. & Hood, W.M. (2005). Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold. *Journal of Apicultural Research*, 44(4), 157–162. DOI:10.1080/00218839.2005.11101171
- Delaplane, K.S., Pietravalle, S., Brown, M.A. & Budge, G.E. (2015). Honey Bee Colonies Headed by Hyperpolyandrous Queens Have Improved Brood Rearing Efficiency and Lower Infestation Rates of Parasitic Varroa Mites. *PLoS ONE* 2015, 10, 0142985.
- Delfinado-Baker, M. (1988). Variability and biotypes of *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Am. Bee J.* 128, 567–568
- Démares, F.J., Schmehl, D., Bloomquist, J.R., Cabrera, A.R., Huang, Z.Y., Lau, P., Rangel, J., Sullivan, J., Xie, X. & Ellis, J.D. (2022). Honey Bee (*Apis mellifera*) Exposure to Pesticide Residues in Nectar and Pollen in Urban and Suburban Environments from Four Regions of the United States. *Environ. Toxicol. Chem.* 41, 991–1003
- Deodikar, G., Thakar, C.V. & Tonapi, K.V. (1958). Evolution in the genus *Apis* and its bearing on breeding better strains on Indian bees. *Proceeding of the International Beekeeping Congress*, 17,245250.

- Derecka, K., Blythe, M.J., Malla, S., Genereux, D.P., Guffanti, A., Pavan, P., *et al.* (2013). Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS One* 8:e68191. DOI:10.1371/journal.pone.0068191
- Deroost, K., Pham, T.-T., Opdenakker, G. & Van Den Steen, P.E. (2015). The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiology Reviews* 40, 208–57.
- Desneux, N., Decourtye, A. & Delpuech, J.M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial Arthropods. *Annu Rev Entomol.* 52: 81-106. DOI:10.1146/annurev.ento.52.110405.091440 PMID: 16842032
- Devi, S., Rana, K., Negi, N., Sharma, H.K. & Thakur, M. (2021). Seasonal incidence of brood diseases in hives of Asian honey bee (*Apis cerana* F.) correlates with colony and weather parameters. *The Pharma Innovation Journal* 10, 1945–51.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte Y., Belzuncies, L.P., Decourtye, A., Kretschmar, A., Severine Suchail, Brunet, J.L. & Alaux, C. (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLOS ONE* 8(8): e72016. DOI:10.1371/journal.pone.0072016
- Di Prisco, G. *et al.* (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 18466–18471
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F. & Pennacchio, F. (2016). A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 3203–3208. DOI:10.1073/pnas.1523515113
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F. Jr., Evans, J.D. & Chen, Y. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* 92, 151–155.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P. & Ellis, J.D. (2013). Standard Methods for *Varroa* Research. *J. Apic. Res.* 52, 1–54. DOI:10.3896/IBRA.1.52.1.09.
- Dietemann, V., Pflugfelder, J., Anderson, D. *et al.* (2012). *Varroa destructor*: Research avenues towards sustainable control. *Journal of Apicultural Research* 51, 125–32.
- Dietz, A. (1982). Honey bees. In: Hermann, HR (ed) *Social Insects Vol.3*. Academic Press; New York, USA; pp 323-360. 417/83
- Dietz, A., Krell, R. & Eischen, F.A. (1985). Preliminary investigation on the distribution of Africanized honey bees in Argentina. *Apidologie*, 16(2), 99-108. DOI:10.1051/apido:19850201
- Dill, G.M. (2008). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Manag Sci.* 61(3):219–24.
- Ding, G., Fondevila, N., Palacio, M.A., Merke, J., Martinez, A., Camacho, B., Aignasse, A., Figini, E., Rodriguez, G., Lv, L., Liu, Z & Shi, W. (2016). Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina. *Rev Sci Tech Of Int Epiz* 35(3):825–833. DOI:10.20506/rst.35.3.2572
- Dittes, J., Aupperle-Lellbach, H., Schäfer, M.O., Mülling, C.K.W. & Emmerich, I.U. (2020). Veterinary Diagnostic Approach of Common Virus Diseases in Adult Honeybees. *Vet. Sci.* 7, 159.
- Djukic, M., Erler, S., Leimbach, A., Grossar, D., Charrière, J.D., Gauthier, L., Hartken, D., Dietrich, S., Nacke, H., Daniel, R. & Poehlein A. (2018). Comparative genomics and description of putative virulence factors of *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood disease in honey bees. *Genes.* 9: 419
- Dobelmann, J., Felden, A. & Lester, P. J. (2020). Genetic strain diversity of multi-host RNA viruses that infect a wide range of pollinators and associates is shaped by geographic origins. *Viruses* 12(3):358. DOI:10.3390/v12030358.
- Dogantzis, K.A. & Zayed, A. (2019). Recent advances in population and quantitative genomics of honey bees. *Current Opinion in Insect Science* Volume 31, Pages 93-98. DOI:10.1016/j.cois.2018.11.010
- Dogantzis, K.A., Tiwari, T., Conflitti, I.M., Dey, A., Patch, H.M., Muli, E.M., Garnery, L., Whitfield, C., Stolle, E., Alqarni, A.S., Allsopp, M.H. & Zayed, A. (2021). Thrice out of Asia and the adaptive radiation of the western honey bee. *Sci. Adv.*, 7 (49), eabj2151. DOI:10.1126/sciadv.abj2151

- Dolan, P.T., Whitfield, Z.J. & Andino, R. (2018). Mechanisms and Concepts in RNA Virus Population Dynamics and Evolution. *Annu. Rev. Virol.* 5, 69–92.
- Dolezal, A.G. & Toth, A.L. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Curr. Opin. Insect Sci.* 26: 114–119
- Dolezal, A.G., Carrillo-Tripp, J., Judd, T.M., Allen Miller, W., Bonning, B.C. & Toth, A.L. (2019). Interacting stressors matter: diet quality and virus infection in honeybee health. *R. Soc. Open Sci.* 6: 181803.
- Dolezal, A.G., Hendrix, S.D., Scavo, N.A., Carrillo-Tripp, J., Harris, M.A., Wheelock, M.J., O’Neal, M.E. & Toth, A.L. (2016). Honey bee viruses in wild bees: viral prevalence, loads, and experimental inoculation. *Plos One* 11(11):e0166190. DOI:10.1371/journal.pone.0166190
- Domingo, E. & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genet.* 15, e1008271.
- Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. (2012). Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 159–216.
- Dominguez-Ayala, R., Moo-Valle, H., May-Itza, W. J., MedinaPeralta, S. & Quezada-Euan, J. J. G. (2016). Stock composition of northern neotropical honey bees: Mitotype and morphotype diversity in Mexico (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 47, 642–652. DOI:10.1007/s13592-015-0414-6
- Dooley, G.P., Prenni, J.E., Prentiss, P.L., Cranmer, B.K., Andersen, M.E. & Tessari, J.D. (2006). Identification of a novel hemoglobin adduct in Sprague Dawley rats exposed to atrazine. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 692–700.
- Dosch, C., Manigk, A., Streicher, T., Tehel, A., Paxton, R. & Tragust, S. (2021). The Gut Microbiota Can Provide Viral Tolerance in the Honey Bee. *Microorganisms* 9, 871.
- Doublet, V., *et al.* (2017). Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics* 18.
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.R., Moritz, R.F.A. & Paxton, R.J. (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Microbiol.* 17, 969–983. DOI:10.1111/1462-2920.12426
- Doublet, V., Natsopoulou, M.E., Zschiesche, L. & Paxton, R.J. (2015). Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J. Invertebr. Pathol.* 124, 31–34.
- Dubois, E., Dardouri, M., Schurr, F., Cougoule, N., Sircoulomb, F. & Thiéry, R. (2020). Outcomes of honeybee pupae inoculated with deformed wing virus genotypes A and B. *Apidologie* 51:18–34. DOI:10.1007/s13592-019-00701-z
- Duke, S.O. & Powles, S.B. (2008). Mini-review glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 6, 319–325
- Durrer, S. & Schmid-Hempel, P. (1994). Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 258, 299–302
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., *et al.* (2013). Flight Behavior and Pheromone Changes Associated to *Nosema ceranae* Infection of Honey Bee Workers (*Apis mellifera*) in Field Conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 42–51. DOI: 10.1016/j.jip.2013.01.002
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Tchamitchian, S., Bonnet, M., Cousin, M., Kretschmar, A., Brunet, J.-L. & Le Conte, Y. (2016). Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens’ physiology and survival. *Sci. Rep.* 6, 31430. DOI:10.1038/srep31430
- Düttmann, C., Flores, B., Sheleby-Elías, J., Castillo, G., Osejo, H., Bermudez, S., *et al.* (2021). Morphotype and haplotype identification of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), and its importance for apiculture in Nicaragua. *Exp Appl Acarol.* 83: 527–544. DOI:10.1007/s10493-021-00603-9 PMID: 33687585
- Düttmann, C., Flores, B., Sheleby-Elías, J., Castillo, G., Rodriguez, D., Maggi, M., *et al.* (2022). Africanized honeybee population (*Apis mellifera* L.) in Nicaragua: Forewing length and mitotype lineages. *PLoS ONE* 17(4): e0267600. DOI:10.1371/journal.pone.0267600

- Dynes, T.L., De Roode, J.C., Lyons, J.I., Berry, J.A., Delaplane, K.S. & Brosi, B.J. (2017). Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 48, 93–101. DOI:10.1007/s13592-016-0453-7
- EFSA -European Food Safety Authority- (2020). Medina-Pastor, P. & Triacchini, G. The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* 18 (4), 6057.
- EFSA, and their Residues (PPR). (2012). Scientific opinion on the science behind the development of a risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and Solitary Bees). *EFSA Journal*, 10(5), 2668.
- Eimanifar, A., Brooks, S.A., Bustamante, T., Ellis, J.D. (2018). Population genomics and morphometric assignment of western honey bees (*Apis mellifera* L.) in the Republic of South Africa. *BMC Genom.* 19, 615.
- Eimanifar, A., Pieplow, J.T., Asem, A. & Ellis, J.D. (2020). Genetic diversity and population structure of two subspecies of western honey bees (*Apis mellifera* L.) in the Republic of South Africa as revealed by microsatellite genotyping. *PeerJ*, 8, e8280.
- Eiri, D.M., Suwannapong, G., Endler, M. & Nieh, J.C. (2015). *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *PLoS ONE* 10, e0126330.
- Eliash, N. & Mikheyev, A. (2020). Varroa mite evolution: a neglected aspect of worldwide bee collapses? *Curr. Opin. Insect Sci.* 39, 21–26. DOI:10.1016/j.cois.2019.11.004.
- Ellis, J.D. & Munn, P.A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86:88–101. DOI:10.1080/0005772X.2005.11417323
- Ellis, J.D., Evans, J.D. & Pettis, J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49:1, 134-136. DOI:10.3896/IBRA.1.49.1.30
- Emsen, B., De la Mora, A., Lacey, B., Eccles, L., Kelly, P.G., Medina-Flores, C.A., Petukhova, T., Morfin, N. & Guzman-Novoa, E. (2020). Seasonality of *Nosema ceranae* infections and their relationship with honey bee populations, food stores, and survivorship in a North American region. *Vet. Sci.* 7, 131.
- Emsen, B., Hamiduzzaman, M.M., Goodwin, P.H. & Guzman-Novoa, E. (2015). Lower virus infections in *Varroa destructor*-infested and uninfested brood and adult honey bees (*Apis mellifera*) of a low mite population growth colony compared to a high mite population growth colony. *PLoS ONE* 10, e0118885.
- Engel, M.S. (1999). The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *J. Hymenoptera Res.* 8(2), 165–196
- Engel, P., Kwong, W.K., McFrederick, Q., Anderson, K.E., Barribeau, S.M., Chandler, J.A., Scott Cornman, R., Dainat, J., de Miranda, J.R., Doublet, V., *et al.* (2016). The bee microbiome: Impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio* 7, e02164-15.
- Erban, T. *et al.* (2017). European foulbrood in Czechia after 40 years: application of next-generation sequencing to analyze *Melissococcus plutonius* transmission and influence on the bacteriome of *Apis mellifera*. *PeerJPreprints* 5: e3816.
- Espinoza, N.O. & Bustos-Obregón, E. (2015). Toxicidad y riesgo ambiental por efecto de insecticidas organofosforados sobre reproductor macho de lombriz de tierra (*Eisenia foetida*). *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 2(4), 723-729.
- Espósito, R.I., Villegas Nigra, H.M. & Gagey, E. (2007). Producción apícola en la provincia de Río Negro. Campaña sanitaria apícola. Temporada 2006-2007. Segundo informe parcial.
- Espegueira Themudo, G., Rey Iglesia, A., RoblesTascón, L., Bruun Jensen, A., da Fonseca, R.R. & Campos, P.F. (2020). Declining genetic diversity of European honeybees along the twentieth century. *Scientific Reports* 10:10520. DOI:10.1038/s41598-020-67370-2
- Evans, A.N., Llanos, J.E.M., Kunin, W.E. & Evison, S.E.F. (2018). Indirect effects of agricultural pesticide use on parasite prevalence in wild pollinators. *Agric. Ecosyst. Environ.* 258, 40–48. DOI:10.1016/j.agee.2018.02.002

- Evans, J. D. & Schwarz, R. S. (2011). Bees brought to their knees: Microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19, 614–620.
- Evans, J. D. & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S62–S72
- Evans, J.D., & Pettis, J.S. (2005). Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution*, 59(10), 2270–2274. DOI:10.1111/j.00143820.2005.tb00935.x
- Evans, J.D., Schwarz, R.S., Chen, Y.P., Budge, G., Cornman, R.S., De la Rua, P., de Miranda, J.R., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Cheng, M.L., Moritz, R.F., Maleszka, R., Muñoz, I. & Pinto, M.A. (2013). Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *J Apic Res* 52(4):1–54. DOI:10.3896/IBRA.1.52.4.11
- Evison, S.E. & Jensen, A.B. (2018). The biology and prevalence of fungal diseases in managed and wild bees. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 26, 105–113. DOI:10.1016/j.cois.2018.02.010.
- Evison, S.E. (2015). Chalkbrood: Epidemiological Perspectives from the Host–Parasite Relationship. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 10, 65–70.
- Evison, S.E., Fazio, G., Chappell, P., Foley, K., Jensen, A.B. & Hughes, W.O. (2013). Host–parasite genotypic interactions in the honey bee: The dynamics of diversity. *Ecol. Evol.* 3, 2214–2222
- Evison, S.E.F., Roberts, K.E., Laurenson, L., Pietravalle, S., Hui, J., Biesmeijer, J.C., Smith, J.E., Budge, G. & Hughes, W.O.H. (2012). Pervasiveness of parasites in pollinators. *PLoS One* 7 (1), e30641. DOI:10.1371/journal.pone.0030641.
- FAO -Food and Agriculture Organization of the United Nations- (2006). Pesticide residues in food – 2005. Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO core assessment group on pesticide residues geneva, Switzerland, 20–29 september 2005. FAO Plant Production and Protection Paper 183. FAO, Rome, Italy. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Glyphosate.pdf. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report13/5.21_GLYPHOSATE__158_.pdf. (Acceso Julio 2022).
- FAOSTAT. (2020). Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura (FAO), División de Estadística - FAO. <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
- FAOSTAT. (2021). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RPA>
- FAOSTAT. (2021). <https://www.fao.org/food-agriculture-statistics/data-release/data-release-detail/en/c/1644795/>
- Farina, W.M. & Wainseboim, A.J. (2001). Thermographic recordings show that honeybees may receive nectar from foragers even during short trophallactic contacts. *Insectes Sociaux* 48: 01-03.
- Farina, W.M., Balbuena, M.S., Herbert, L.T., Mengoni Goñalons, C. & Vázquez, D.E. (2019). Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: individual impairments with implications for the hive. *Insects* 10 (10), 354. DOI:10.3390/insects10100354 PMID:31635293
- Farooqui, T. (2013). A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis. *Neurochemistry International* 62: 122–136. DOI:10.1016/j.neuint.2012.09.020 PMID:23059446
- Faurot-Daniels, C. *et al.* (2020). Longitudinal monitoring of honey bee colonies reveals dynamic nature of virus abundance and indicates a negative impact of Lake Sinai virus 2 on colony health. *PLoS ONE* 15, e0237544.
- Fazier, M., Muli, E., Conklin, T., Schmehl, D., Torto, B., Frazier, J., *et al.* (2010). A scientific note on *Varroa destructor* found in East Africa; threat or opportunity? *Apidologie*. 41(4):463–5.
- Feliciano-Cardona, S., Döke, M.A., Aleman, J., Agosto-Rivera, J.L., Grozinger, C.M. & Giray, T. (2020), Honey Bees in the Tropics Show Winter Bee-Like Longevity in Response to Seasonal Dearth and Brood Reduction. *Front. Ecol. Evol.* 8:571094. DOI: 10.3389/fevo.2020.571094

- Ferguson, J. A., Northfield, T. D. & Lach, L. (2018). Honey Bee (*Apis Mellifera*) Pollen Foraging Reflects Benefits Dependent on Individual Infection Status. *Microb. Ecol.* 76, 482–491. DOI: 10.1007/s00248-018-1147-7
- Fernandes, M., Fernandes, F., Picanço, M., Queiroz, R., Silva, R. & Huertas, A. (2008). Physiological selectivity of insecticides to *Apis mellifera* (hymenoptera: apidae) and *Protonectarina sylveirae* (hymenoptera: vespidae) in citrus. *Sociobiology* 51, 765–774.
- Fernández de Landa, G., Brasesco, C., Quintana, S., Di Gerónimo, V., Junges, C., Porrini, L., Reynaldi, J.F., Eguaras, M. & Maggi, M. (2020). Lake sinai virus (LSV), un novedoso virus que se encuentra infectando las abejas melíferas en Argentina. *Centro de Investigación En Abejas Sociales—CIAS*.36:14–16.
- Fernández, A.D.G., Mancipe, L.C. & Fernández, D.C. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18(1), 84-92. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-52562010000100009&lng=en&tlng=es.
- Fernandez, N. & Coineau, Y. (2007). Varroa the Serial Bee Killer Mite; Atlantica: Biarritz, France, EAN: 9782843949500.
- Ferrari, C.A., Otero, R. & Collía, J.A. (2011). Argentine beekeeping and its regions. 1ª ed. Buenos Aires: Consejo Federal de Inversiones. 200p. ISBN: 978-978-510-158-6
- Ferreira de Souza, A.P., Rodrigues, N.R., Guillermo, F., Reyes Reyes, F.G. (2020). Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in Brazilian honey. *Food Addit. Contam. B* 14 (1), 40–47.
- Fewell, J.H. & Bertram, S. M. (2002). Evidence for genetic variation in worker task performance by African and European honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52, 318–325. DOI:10.1007/s00265-002-0501-3
- Figuerola, L. L. *et al.* (2020). Landscape simplification shapes pathogen prevalence in plant-pollinator networks. *Ecol. Lett.* 23, 1212–1222
- Fijen, T.P.M., Scheper, J.A., Boom, T.M., Janssen, N., Raemakers, I. & Kleijn, D. (2018). Insect pollination is at least as important for marketable crop yield as plant quality in a seed crop. *Ecology Letters* 21, 1704–13.
- Fletcher, D.J.C. (1977a). A preliminary analysis of rapid colony development in *Apis mellifera adansonii* L. Eighth International Congress of the IUSSI, Pudoc, Wageningen: 144–145.
- Fletcher, D.J.C. (1977b). Evaluation of introductions of European honey-bees into southern and Eastern Africa. Eighth International Congress of the IUSSI, Pudoc, Wageningen: 146–147.
- Fletcher, D.J.C. (1978). The African bee, *Apis mellifera adansonii*, in Africa. *Annual Review of Entomology*. 23: 151–171.
- Flores, J.M., Ruiz, J.A., Ruz, J.M., Puerta, F., Bustos, M., Padilla, F. & Campano, F. (1996). Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie*. 27:185–192.
- Floyd, A.S., Mott, B.M., Maes, P., Copeland, D.C., McFrederick, Q.S. & Anderson, K.E. (2020). Microbial Ecology of European Foul Brood Disease in the Honey Bee (*Apis mellifera*): Towards a Microbiome Understanding of Disease Susceptibility. *Insects*, 11(9), 555. DOI:10.3390/insects11090555
- Fontana, A.R., Camargo, A.B. & Altamirano, J.C. (2010). Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6334-6341.
- Forfert, N. *et al.* (2017). Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity. *PLoS ONE* 12, e0186109
- Forfert, N., Natsopoulou, M.E., Frey, E., Rosenkranz, P., Paxton, R.J. & Moritz, R.F.A. (2015). Parasites and Pathogens of the Honeybee (*Apis mellifera*) and Their Influence on Inter-Colonial Transmission. *PLoS ONE* 10, e0140337.
- Formato, G., Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Martín-Hernández, R., Milito, M., Croppi, S. & Higes, M. (2022). Nosemosis Prevention and Control. *Appl. Sci.* 12, 783. DOI:10.3390/app12020783
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103:5–9. DOI:10.1016/j.jip.2009.06.016

- Forsgren, E., Budge, G.E., Charrière, J.D. & Hornitzky, M.A.Z. (2013). Standard Methods for European Foulbrood Research. *J. Apic. Res.* 52(1), 1–14. DOI:10.3896/IBRA.1.52.1.12.
- Forsgren, E., de Miranda, J.R., Isaksson, M., Wei, S. & Fries, I. (2009). Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.* 47:87–97. DOI:10.1007/s10493-008-9204-4
- Forsgren, E., Lundhagen, A.C., Imdorf, A. & Fries, I. (2005). Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microbial Ecology* 50 (3): 369–374. DOI:10.1007/s00248-004-0188-2.
- Francis, R.M., Kryger, P., Meixner, M., Bouga, M., Ivanova, E., Andonov, S., Berg, S., Bienkowska, M., Büchler, R. & Charistos, L. (2014). The genetic origin of honey bee colonies used in the COLOSS Genotype-Environment Interactions Experiment: A comparison of methods. *J. Apic. Res.*, 53, 188–204.
- Francis, R.M., Nielsen, S.L. & Kryger, P. (2013). Varroa-Virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* 8, e57540.
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., & Kryger, P. (2013). Patterns of viral infection in honey bee queens. *Journal of General Virology*, 94 (3), 668-676. DOI:10.1099/vir.0.047019-0
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M. & Cornuet, J.M. (2000). Hybrid origin of honey bees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*. 9:907-921. DOI:10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B.P., Hepburn, H.R., Solignac, M., *et al.* (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 86: 420–430. DOI:10.1046/j.1365-2540.2001.00842.x PMID: 11520342
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M. & Cornuet, J. M. (1998). The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52, 1119–1134. DOI:10.1111/j.1558-5646.1998.tb01839.x
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2010). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Franklin, E.L. & Raine, N.E. (2019). Moving beyond honeybee-centric pesticide risk assessments to protect all pollinators. *Nat. Ecol. Evol.* 3 (10), 1373–1375.
- Franzen, C. (2008). Microsporidia: a review of 150 years of research. *The Open Parasitology Journal*, 2: 1–34.
- Freeland, J. R., Kirk, H. & Petersen, S. D. (2011). *Molecular Ecology*. Wiley-Blackwell.
- Freiberg, M., De Jong, D., Message, D., Cox-Foster, D. (2012) First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 11 , 3310–3314
- Frey, E. & Rosenkranz, P. (2014). Autumn Invasion Rates of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) Into Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies and the Resulting Increase in Mite Populations, *Journal of Economic Entomology*, Volume 107, Issue 2, 1. DOI:10.1603/EC13381
- Friedli, A., Williams, G.R., Bruckner, S., Neumann, P. & Straub, L. (2020). The weakest link: haploid honey bees are more susceptible to neonicotinoid insecticides. *Chemosphere* 242:125145. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.125145
- Fries, I. & Camazine, S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honeybee epi demiology. *Apidologie*. 32 (3): 199–214. DOI:10.1051/apido:2001122.
- Fries, I. (1993). *Nosema apis*—A parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74, 5–19.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 103, S73–S79.
- Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y.P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R. & Natsopoulou, M. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *J. Apic. Res.* 52, 1–28.

- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemend, S.B. & Pieniazek, N.J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32, 356–365.
- Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A., & Rosenkranz, P. (2003). Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. Apidologie, 34, 389–397.
- Fries, I., Imdorf, A. & Rosenkranz, P. (2006a). Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. Apidologie 37, 564–570. DOI:10.1051/apido:2006031
- Fries, I., Lindström, A. & Korpela, S. (2006b). Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). Veterinary Microbiology 114 (3–4): 269–274. DOI:10.1016/J.VETMIC.2005.11.068.
- Fuchs, S. & Langenbach, K. (1989). Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 20(3):257–66. DOI:10.1051/apido:19890308
- Fuentes, G., Iglesias, A., Mitton, G., Ramos, F., Brasesco, C. & Maggi, M. (2022). *Varroa destructor* en Latinoamérica: una introducción a la biología, ecología y control en la región. EUNK - Revista Científica de Abejas y Apicultores. Volumen 1, Número 2. DOI:10.52559/eunk.v1i2.30
- Fünfhaus, A., Ebeling, J. & Genersch, E. (2018). Bacterial pathogens of bees. Current Opinion in Insect Science 26: 89–96. DOI:10.1016/j.cois.2018.02.008.
- Fürst, M.A., McMahon, D.P., Osborne, J.L., Paxton, R.J. & Brown, M.J.F. (2014). Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. Nature 506:364–368
- Gaggia, F., Baffoni, L., Stenico, V., Alberoni, D., Buglione, E., Lilli, A., Di Gioia, D. & Porrini, C. (2015). Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood. Bulletin Insect 68:321–327
- Gajda, A.M., Mazur, E.D., Bober, A.M. & Czopowicz, M. (2021). *Nosema ceranae* interactions with *Nosema apis* and black queen cell virus. Agriculture 11, 963.
- Galajda, R., Valenčáková, A., Sučík, M. & Kandráčková, P. (2021). *Nosema* Disease of European Honey Bees. J. Fungi 7, 714. DOI:10.3390/jof7090714
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J. & Vaissière, B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecol Econ. 68: 810–21
- Gamboa, J.E., Umaña-Castro, R., Sancho-Blanco, C. & Orozco-Aceves, M. (2023). Isolation, identification, and characterization of bacterial strains with potential for degradation of the pesticides chlorothalonil and chlorpyrifos. Uniciencia, 37(1), 1–16. DOI:10.15359/ru.37-1.26
- Gamboa, V., Ravoet, J., Brunain, M., Smagghe, G., Meeus, I., Figueroa, J., Riaño, D. & de Graaf, D.C. (2015). Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. J Invertebr Pathol 129:36–39
- Gandon, S., Buckling, A., Decaestecker, E. & Day, T. (2008). Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. J. Evol. Biol. DOI:10.1111/j.1420-9101.2008.01598.x.
- García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., González-Porto, A.V., Marin, P., Meana, A. & Higes, M. (2010). Natural Infection by *Nosema Ceranae* Causes Similar Lesions as in Experimentally Infected Caged-Worker Honey Bees (*Apis Mellifera*). J. Apic. Res. 49, 278–283. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.08
- Garibaldi, L.A., Requier, F., Rollin, O. & Andersson, G.K. (2017). Towards an integrated species and habitat management of crop pollination. 21:105–114. DOI:10.1016/j.cois.2017.05.016
- Garibaldi, L.A., Sáez, A., Aizen, M.A., Fijen, T. & Bartomeus, I. (2020). Crop pollination management needs flower– visitor monitoring and target values. Journal of Applied Ecology 57, 664–70
- Garnery, L., Cornuet, J.M. & Solignac, M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. Mol Ecol. 1992; 1: 145–154. DOI:10.1111/j.1365-294x.1992.tb00170.x PMID: 1364272

- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G. & Cornuet, J.M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49, Birkhäuser Verlag, Switzerland.
- Garnery, L., Vautrin, D., Cornuet, J.M. & Solignac, M. (1991). Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Aidologie* 22(1), 87-92. DOI:10.1051/apido:19910111
- Garrido, C., Rosenkranz, P., Paxton, R.J. & Gonçalves, L.S. (2003). Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie* 34:535–541. DOI:10.1051/apido:2003041
- Garrido-Bailón, E., Bartolomé, C., Prieto, L., Botías, C., Martínez-Salvador, A., Meana, A., *et al.* (2012). The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Exp Parasitol.* 132:530–536
- Garrido-Bailón, E., Higes, M., Martínez-Salvador, A., Antúnez, K., Botías, C., Meana, A., Prieto, L. & Martín-Hernández, R. (2013). The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology*, 6(6): 731-739. DOI: 10.1111/1751-7915.12070
- Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., *et al.* (2007). Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie* 38: 426–435.
- Geffre, A.C., Travis, D.J., Kohn, J.R. & Nieh, J.C. (2021). Preliminary analysis shows that feral and managed honey bees in southern California have similar levels of viral pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 1–3. DOI:10.1080/00218839.2021.2001209
- Geldmann, J. & González-Varo, J.P. (2018). Conserving honey bees does not help wildlife. *Science*. 359: 392–393.
- Genchi García, M.L., Plischuk, S., Bravi, C.M. & Reynaldi, F.J. (2019). An Overview on Honeybee Colony Losses in Buenos Aires Province, Argentina. *Sociobiology* 66(1): 75-80. DOI: 10.13102/sociobiology.v66i1.3366
- Genchi García, M.L., Reynaldi, F.J. & Bravi, C.M. (2018). An update of Africanization in honey bee (*Apis mellifera*) populations in Buenos Aires, Argentina, *Journal of Apicultural Research*, DOI:10.1080/00218839.2018.1494887
- Genersch, E. & Aubert, M. (2010). Emerging and Re-Emerging Viruses of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *Vet. Res.* 41, 54.
- Genersch, E. (2005). Development of a rapid and sensitive RT-PCR method for the detection of deformed wing virus, a pathogen of the honey bee (*Apis mellifera*). *Vet. J.* 169, 121–123.
- Genersch, E. *et al.* (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (Pt 3): 501–511. DOI:10.1099/ijs.0.63928-0.
- Genersch, E., Evans, J.D. & Fries, I. (2010). Honey bee disease overview. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S2–S4.
- Geslin, B., Gauzens, B., Baude, M., Dajoz, I., Fontaine, C., Henry, M. *et al.* (2017). Massively Introduced Managed Species and Their Consequences for Plant-Pollinator Interactions. *Adv. Ecol. Res.* 57: 147–199.
- Giacobino, A., Bulacio Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Salto, C., & Signorini, M. (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. DOI:10.1016/j.prevetmed.2014.04.002
- Giacobino, A., Molineri, A., Bulacio-Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciángelo, G., Pietronave, H., Pacini, A., Salto, C. & Signorini, M. (2016a). Key management practices to prevent high infestation levels of *Varroa destructor* in honeybee colonies at the beginning of the honey yield season. *Prev. Vet. Med.* 131 : 95-102. DOI:10.1016 /j.prevetmed.2016.07.013.
- Giacobino, A., Molineri, A.I., Pacini, A., Fondevila, N., Pietronave, H., Rodríguez, G., Palacio, A., Bulacio Cagnolo, N., Orellano, E., Salto, C.E., *et al.* (2016b). *Varroa destructor* and Viruses Association in Honey Bee Colonies under Different Climatic Conditions. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 407–412.

- Giacobino, A., Pacini, A., Molineri, A. *et al.* (2018) Potential associations between the mite *Varroa destructor* and other stressors in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.) in temperate and subtropical climate from Argentina. *Prev Vet Med* 159:143–152. DOI:10.1016/j.prevetmed.2018.09.011
- Gianessi, J.C.L. (1999). Herbicide Tolerant Soybeans: Why Growers Are Adopting Roundup Ready Varieties. <http://agbioforum.org/v2n2/v2n2a02-carpenter.htm>.
- Gierer, F., Vaughan, S., Slater, M., Thompson, H.M., Elmore, J.S. & Girling, R.D. (2019). A review of the factors that influence pesticide residues in pollen and nectar: Future research requirements for optimising the estimation of pollinator exposure. *Environmental Pollution*, 249, 236–247.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F. & Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40, 117–123.
- Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S. & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 16, 401–4026.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N.E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*. 491: 105–108. DOI:10.1038/nature11585 PMID:23086150
- Gilliam, M. & Vandenberg, J.D. (1997). Fungi. In *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*; Morse, R., Flottum, K., Eds.; A I Root Co.: Medina, WA, USA, pp. 81–110.
- Gisder, S. & Genersch, E. (2017). Viruses of commercialized insect pollinators. *J. Invertebr. Pathol.* 147, 51–59
- Gisder, S. *et al.* (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3032–3038. DOI:10.1128/AEM.03097-09
- Gisder, S., Aumeier, P. & Genersch, E. (2009). Deformed wing virus: Replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 90, 463–467.
- Gisder, S., Möckel, N., Eisenhardt, D. & Genersch, E. (2018). In Vivo evolution of viral virulence: Switching of deformed wing virus between hosts results in virulence changes and sequence shifts. *Environ. Microbiol.* 2018, 20, 4612–4628.
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A. & Genersch, E. (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ. Microbiol.* 13, 404–413, DOI:10.1111/j.1462- 2920.2010.02346.x
- Goblirsch, M. (2018). *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 49, 131–150. DOI:10.1007/s13592- 017-0535-1
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y. & Spivak, M. (2013). Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PloS One* 8, 1–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0058165
- Godfray, H.C.J., Blacquière, T., Field, L.M., Hails, R.S., Petrokofsky, G., Potts, S.G., Raine, N.E., Vanbergen, A.J. & McLean, A.R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281: 20140558. DOI:10.1098/rspb.2014.0558 PMID:24850927
- Gomes, I.N. (2017). Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* e *Apis mellifera*. Dissertation, Universidade Federal de Viçosa. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/11010>.
- Gonzalez, L.S. (1974). The introduction of the African Bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. *American Bee Journal*, 114, 414–419. DOI:10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.x
- Gonzalez-Cabrera, J., Bumann, H., Rodríguez-Vargas, S., Kennedy, P.J., Krieger, K., Altreuther, G., Hertel, A., Hertlein, G., Nauen, R., Williamson, M.S. (2018). A single mutation is driving resistance to pyrethroids in European populations of the parasitic mite, *Varroa destructor*. *J. Pest Sci.* DOI:10.1007/s10340-018-0968-y.
- González-Cabrera, J., Davies, T.G.E., Field, L.M., Kennedy, P.J., Williamson, M.S. (2013). An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa destructor*. *PLoS One* 8. DOI:10.1371/journal.pone.0082941

- González-Cabrera, J., Rodríguez-Vargas, S., Davies, T.G.E., Field, L.M., Schmehl, D., Ellis, J.D., Krieger, K., Williamson, M.S. (2016). Novel mutations in the voltage-gate sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the southeastern USA. PLoS One 11, e0155332. DOI:10.1371/journal.pone.0155332
- Goodwin, M., Ten Houten, A., Perry, J. & Blackman, R. (1990). Cost benefit analysis of using fumagillin to treat nosema. New Zealand Beekeeper 208, 11–12.
- Gough, H.J., Mcindoe, E.C. & Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L. 1981-1992) Journal of Apicultural Research 33(2): 119-125
- Goulson, D. & Nicholls, E. (2022). Anthropogenic influences on bee foraging. Science 375, 970–2.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. J Appl Ecol. 50: 977–987.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. & Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites. Pesticides and lack of flowers. Science 347(6229), 1435–1445. DOI:10.1126/science.1255957
- Govan, V.A., Allsopp, M.H. & Davison, S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Appl Environ Microbiol.; 65:2243–2245.
- Grab, H., Brokaw, J., Anderson, E., Gedlinske, L., Gibbs, J., Wilson, J., Loeb, G., Isaacs, R. & Poveda, K. (2019). Habitat enhancements rescue bee body size from the negative effects of landscape simplification. J. Appl. Ecol. 1365–2664, 13456.
- Graciano Villa, L.A. (2018). Niveles de infestación de *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) en abejas africanizadas (*Apis mellifera scutellata* hib). Tesis de Magister. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia
- GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com
- Grau, D., Grau, N., Gascuel, Q., Paroissin, C., Stratonovitch, C., Lairon, D., Devault, D.A. & Di Cristofaro, J. (2022). Quantifiable urine glyphosate levels detected in 99% of the French population, with higher values in men, in younger people, and in farmers. Environ. Sci. Pollut. Res. 29, 32882–32893.
- Gray, A., Adjlane, N., Alireza, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Bugeja Douglas, A., Cadahía, L., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Cornelissen, B., Amaro da Costa, C., Danneels, E., Danihlík, J., Dobrescu, C., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., Ilieva Arakelyan, I., Johannesen, J., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Mazur, E., Medina-Flores, C.A., Mutinelli, F., Omar, E.M., Patalano, S., Raudmets, A., San Martin, G., Soroker, V., Stahlmann-Brown, P., Stevanovic, J., Uzunov, A., Vejsnaes, F., Williams, A. & Brodschneider, R. (2022). Honey bee colony loss rates in 37 countries using the COLOSS survey for winter 2019–2020 the combined effects of operation size, migration and queen replacement, Journal of Apicultural Research. DOI: 10.1080/00218839.2022.2113329
- Gray, A., Adjlane, N., Arab, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Cornelissen, B., Amaro da Costa, C., Dahle, B., Danihlík, J., Drazic, M. M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gajda, A., de Graaf, D. C., Gregorc, A., et al. (2020). Honey bee colony winter loss rates for 35 countries participating in the COLOSS survey for winter 2018-2019, and the effects of a new queen on the risk of colony winter loss. Journal of Apicultural Research, 59(5), 744–751. DOI:10.1080/00218839.2020.1797272
- Gray, A., Brodschneider, R., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Cornelissen, B., Amaro da Costa, C., Csaki, T., Dahle, B., Danihlík, J., Drazic, M. M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., de Graaf, D., Gregorc, A., et al. (2019). Loss rates of honey bee colonies during Winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. Journal of Apicultural Research, 58(4), 479–485. DOI:10.1080/00218839.2019.1615661
- Graystock, P., Ng, W.H., Parks, K. et al. (2020). Dominant bee species and floral abundance drive parasite temporal dynamics in plant-pollinator communities. Nat Ecol Evol 4, 1358–1367. DOI:10.1038/s41559-020-1247-x
- Graystock, P., Yates, K., Darevill, B., Goulson, D. & Hughes, W.O.H. (2013a). Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. J. Invertebr. Pathol. 114, 114–119.

- Graystock, P., Yates, K., Evison, S.E.F., Darvill, B., Goulson, D. & Hughes, W.O.H. (2013b). The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. *J. Appl. Ecol.* 50 (5), 1207–1215. DOI:10.1111/1365-2664.12134
- Greene, J.K., Turnipseed, S.G., Sullivan, M.J. & Herzog, G.A. (1999). Boll damage by southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) and tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) caged on transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. *J. Econ Entomol.* 92: 941–944.
- Grillone, G., Laurino, D., Manino, A. & Porporato, M. (2017). Toxicity of thiametoxam on in vitro reared honey bee brood. *Apidologie*. DOI:10.1007/s13592-017-0506-6
- Grossar, D., Kilchenmann, V., Forsgren, E., Charrière, J.D., Gauthier, L., Chapuisat, M. & Dietemann, V. (2020). Putative determinants of virulence in *Melissococcus plutonius*, the bacterial agent causing European foulbrood in honey bees. *Virulence* 11: 554–567. DOI:10.1080/21505594.2020.1768338
- Grosso, J.P. (2018). El rol de las experiencias tempranas sobre la plasticidad del sistema olfatorio en la abeja *Apis mellifera*: una aproximación fisiológica, morfológica y comportamental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Grozinger, C. & Robinson, G.E. (2015). The power and promise of applying genomics to honey bee health. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 124–132. DOI:10.1016/j.cois.2015.03.007.
- Grozinger, C.M. & Flenniken, M.L. (2019). Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annu. Rev. Entomol.* 64, 205–226.
- Grupe, A.C. & Quandt, A.C. (2020). A growing pandemic: A review of *Nosema* parasites in globally distributed domesticated and native bees. *PLoS Pathog.* 16 (6): e1008580. DOI:10.1371/journal.ppat.1008580.
- Guarna, M.M., Melathopoulos, A.P., Huxter, E., Iovinella, I., Parker, R., Stoyanov, N., Tam, A., Moon, K.-M., Chan, Q.W.T., Pelosi, P., *et al.* (2015). A search for protein biomarkers links olfactory signal transduction to social immunity. *BMC Genom.* 16.
- Guerra, J., Goncalves, L.S. & De Jong, D. (2000). Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) are more efficient at removing worker brood artificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans than are Italian bees or Italian/Africanized hybrids. *Genetics and Molecular Biology.* 23(1):89–92. DOI:10.1590/S1415-47572000000100016
- Guilcamaigua, D. & Chancusig, E. (2017). Comparación de indicadores ambientales en tres casos de agricultura: tradicional, orgánica y convencional. *Antropología Cuadernos de Investigación*, (17), 71-85.
- Guimarães-Cestaro, L., Serrão, J. E., Martins, M. F., Martínez, L. C., Alves, M. L. T. M. F., Lazzarini, K. R. G., *et al.* (2024). Viruses, microsporidia and glyphosate residues in Africanized honey bees *Apis mellifera*, under field conditions. *Journal of Apicultural Research* 63(2), 245–255. DOI:10.1080/00218839.2024.2307765
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Kalpana & Agnihotri, N.P. (2002). Leaching behavior of imidacloprid formulations in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 502–8. DOI:10.1007/s00128-001-0283-8
- Guzman-Novoa, E. & Morfin, N. (2019). Disease resistance in honey bees (*Apis mellifera* L.) at the colony and individual levels. In *Comprehensive Biotechnology*, 3rd ed.; Moo-Young, M., Ed.; Pergamon Press: Oxford, UK, Volume 4, pp. 811–817.
- Guzman-Novoa, E., Sanchez, A., Page, R.E.Jr. & Garcia, T. (1996). Susceptibility of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) and their hybrids to *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 27, 93–103. DOI:10.1051/apido:19960204
- Guzmán-Novoa, E., Correa Benítez, A., Espinosa Montaña, L.G. & Guzmán-Novoa, G. (2011a). Colonization, impact and control of Africanized honey bees in Mexico. *Veterinaria México*, 42(2), 149–178.
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P.G. & Correa-Benítez, A. (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

- Guzman-Novoa, E., Emsen, B., Unger, P., Espinosa-Montañón, L.G. & Petukhova, T. (2012). Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Invertebr. Pathol.*, 110, 314–320.
- Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M.M., Arichaveleta-Velasco, M.E., Koleoglu, G., Valizadeh, P. & Correa-Benitez, A. (2011b). *Nosema ceranae* has parasitized Africanized honey bees in Mexico since at least 2004. *Journal of Apicultural Research*, 50: 167–169.
- Guzman-Novoa, E., Vandame, R. & Arechaveleta, M.E. (1999). Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie*. 30(2-3):173–182. DOI:10.1051/apido:19990207
- Hafner, M. S. *et al.* (1994). Disparate Rates of Molecular Evolution in Cospeciating Hosts and Parasites. *Science* (80-). 265, 1087–1090.
- Haith, D.A. (2010). Ecological Risk Assessment of Pesticide Runoff from Grass Surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6496–6502. DOI:10.1021/es101636y
- Hall, H.G. & McMichael, M.A. (2001). Frequencies of restriction fragment-length polymorphism indicate that neotropical honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations have African and west European origins. *Annals of the Entomological Society of America*, 94(5), 670-676. DOI:10.1603/0013-8746(2001)094[0670:FORFLP2.0.CO;2]
- Hall, H.G. & Muralidharan, K. (1989). Evidence from mitochondrial DNA that African honey bee spread as continuous maternal lineages. *Nature*, 399(6221), 211-213. DOI:10.1038/339211a0
- Hall, H.G. & Smith, D.R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(10), 4548-4552. DOI:10.1073/pnas.88.10.4548
- Hall, H.G. (1990). Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honey bees using nuclear DNA RFLPs. *Genetics*, 125, 611-621
- Hallmann, C.A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N. & Schwan, H. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS ONE* 12(10):e0185809. DOI:10.1371/journal.pone.0185809
- Hamiduzzaman, M.M., Guzman-Novoa, E., Goodwin, P.H., Reyes-Quintana, M., Koleoglu, G., Correa-Benitez, A. & Petukhova, T. (2015). Differential responses of Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) to viral replication following mechanical transmission or *Varroa destructor* parasitism. *Journal of Invertebrate Pathology* 126. ISSN 0022-2011. DOI:10.1016/j.jip.2014.12.004.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 1–9.
- Han, B. & Weiss, L.M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens within the Fungal Kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5, 1–26.
- Han, F., Wallberg, A. & Webster, M.T. (2012). From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate?. *Ecology and evolution*, 2(8), 1949-1957.
- Han, W., Tian, Y. & Shen, X. (2018). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*. 192, 59-65.
- Hansen, H. & Brødsgaard, C.J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*;80:5–23.
- Harbo, J.R. & Harris, J.W. (1999). Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *J. Econ. Entomol.*, 92, 261–265.
- Harbo, J.R. & Harris, J.W. (2005). Suppressed mite reproduction explained by the behavior of adult bees. *J. Apic. Res.* 44, 21–23.
- Harbo, J.R. & Hoopingarner, R.A. (1997). Honey bees (Hymenoptera Apidae) in the United States that express resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata Varroidae). *J Econ Entomol.* 90(4):893–8.

- Harbo, J.R., Bolten, A.B., Rinderer, T.E. & Collins, A.M. (1981). Development periods for eggs of Africanized and European honeybees. *J Apic Res* 20:156–159. DOI:10.1080/00218839.1981.11100490
- Harper, J.D. (1982). Africanized Bee Has Spread to Equador. *Speedy Bee* 11(1): 7- 8.
- Harpur, B., Kadri, S.M., Orsi, R.O., Whitfield, C.W. & Zayed, A. (2020). Defense response in Brazilian honey bees (*Apis mellifera scutellata* × spp.) is underpinned by complex patterns of admixture. *Genome Biology and Evolution*, 12(8), 1367–1377.
- Harpur, B.A. & Zayed, A. (2013). Accelerated evolution of innate immunity proteins in social insects: Adaptive evolution or relaxed constraint? *Mol Biol Evol* 30(7):1665–1674.
- Harpur, B.A., Chapman, N.C., Krimus, L., Maciukiewicz, P., Sandhu, V., Sood, K., *et al.* (2015). Assessing patterns of admixture and ancestry in Canadian honey bees. *Insectes Sociaux*, 62(4), 479–489. DOI:10.1007/s00040-015-0427-1
- Harpur, B.A., Kent, C.F., Molodtsova, D., Lebon, J.M.D., Alqarni, A.S., *et al.* (2014). Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(7):2614–2619.
- Harpur, B.A., Minaei, S., Kent, C.F. & Zayed, A. (2012). Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Mol. Ecol.* 21, 4414–4421.
- Harris, J.W., Harbo, J.R., Villa, J.D. & Danka, R.G. (2003). Variable population growth of *Varroa destructor* (Msostigmata: Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) during a 10-year period. *Environ. Entomol.*, 32, 1305–1312.
- Harrison, J.F., Fewell, J.H., Anderson, K.E. & Loper, G.M. (2006). Environmental physiology of the invasion of the Americas by Africanized honeybees. *Society for Integrative and Comparative Biology*, 46, 1110–1122. DOI:10.1093/icb/icl046
- Hassanein, M.H. (1953). The influence of *Nosema apis* on the larval honeybee. *Ann. Appl. Biol.* 38, 844–846.
- Hassler, E.E., Cazier, J.A., Hopkins, B., Wilkes, J.T., Smith, K. & Rünzel, M. (2021). A century of discovery: Mining 100 years of honey bee research. *Journal of Apicultural Research* 60, 3–1
- Hatjina, F., Costa, C., Büchler, R., Uzunov, A., Drazic, M., Filipi J. *et al.* (2014). Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *Journal of Apicultural Research*. 53: 233–247.
- Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., Emmanouil, C., *et al.* (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honey bees in vivo. *Apidologie* 44, 467–480. DOI:10.1007/s13592-013-0199-4
- Havard, T., Laurent, M. & Chauzat, M.-P. (2020). Impact of stressors on honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae): some guidance for research emerge from a meta-analysis. *Diversity* 12:7. DOI:10.3390/d12010007
- Haynes, E., Helgason, T., Young, J.P., Thwaites, R. & Budge, G.E. (2013). A typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission events and a study of the distribution of variants. *Environ. Microbiol. Rep.* 5: 525–529.
- Heard, M.S., Baas, J., Dorne, J.L., Lahive, E., Robinson, A.G., Rortais, A., *et al.* (2017). Comparative toxicity of pesticides and environmental contaminants in bees: Are honey bees a useful proxy for wild bee species? *SciTotal Environ.* 578: 357-65.
- Hedtke, K., Jensen, P.M., Jensen, A.B. & Genersch, E. (2011). Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J Invertebr Pathol.* 108:167–173.
- Henriques, D., Costa, C., Rufino, J. & Pinto, M. A. (2022). The mitochondria lgenome of *Apis mellifera siciliana*. *Mitochondrial DNA. B Resour.* 7, 828–830. DOI:10.1080/23802359.2022.2073844
- Henriques, D., Lopes, A. R., Chejanovsky, N., Dalmon, A., Higes, M., Jabal-Uriel, C., *et al.* (2021a). A SNP Assay for Assessing Diversity in Immune Genes in the Honey Bee (*Apis Mellifera* L.). *Sci. Rep.* 11, 1–12. DOI:10.1038/s41598-021-94833-x

- Henriques, D., Parejo, M., Vignal, A., Wragg, D., Wallberg, A., Webster, M. T., & Pinto, M. A. (2018). Developing reduced SNP assays from whole-genome sequence data to estimate introgression in an organism with complex genetic patterns, the Iberian honeybee (*Apis mellifera iberiensis*). *Evolutionary applications*, 11(8), 1270-1282. DOI:10.1111/eva.12623
- Henry, M. & Rodet, G. (2018). Controlling the impact of the managed honey bee on wild bees in protected areas. *Scientific Reports*. 8: 9308.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. (2012). A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* (80). 337, 1453–1453. DOI:10.1126/science.1224930
- Hepburn, R.H. & Radloff, S.E. (1998). *Honey bees of Africa*. Springer Verlag, Berlin.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Ali, N. & Kerkeley, R.C.W. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al., 1993, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 270–27
- Higes, M., et al. (2013a). Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 530–536.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R. & Meana, A. (2007). Experimental Infection of *Apis mellifera* Honeybees With *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217. DOI: 10.1016/j.jip.2006.11.001
- Higes, M., Martín, R. & Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93–95.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., García Palencia, P. & Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10, 2659–2669. DOI:10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x
- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Martín, P. & Meana, A. (2009). Horizontal Transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) From Worker Honeybees to Queens (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 495–498. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00052.x
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Meana, A., et al. (2010). A Preliminary Study of the Epidemiological Factors Related to Honey Bee Colony Loss in Spain. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 243–250. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. & Martín-Hernández, R. (2013b). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5 (1): 17–29. DOI:10.1111/1758-2229.12024.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. & Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae*, a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 17–29.
- Highfield, A.C., El Nagar, A., Mackinder, L.C.M., Noël, L.M.L.J., Hall, M.J., Martin, S.J. & Schroeder, D.C. (2009). Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7212–7220.
- Hirstov, P., Shumkova, R., Georgieva, A., Sirakova, D., Neov, B., Dzhebiri, G. & Radoslavov, G. (2018). Methods for Genotyping of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.: Hymenoptera: Apidae) in Bulgaria. *IntechOpen*. DOI:10.5772/intechopen.73306
- Hirstov, P., Shumkova, R., Palova, N. & Neov, B. (2020). Factors associated with honey bee colony losses: a mini-review. *Veterinary Sciences* 7, 166.
- Hirstov, P., Shumkova, R., Palova, N. & Neov, B. (2021). Honey bee colony losses: why are honey bees disappearing? *Sociobiology* 68 (1), e-5851. DOI:10.13102/SOCIOBIOLOGY.V68I1.5851.
- Hitchcock, J.D. et al. (2019). Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honey bee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 52 (2): 238–246.

- Hitomi, K., Getzoff, E.D. & Schroeder, J.I. (2013). Going green: phytohormone mimetics for drought rescue. *Plant Physiol* 163, 1087–1088.
- Hoage, T.R. & Rothenbuhler, W.C. (1966). Larval honey bee response to various doses of *Bacillus larvae* spores. *Journal of Economic Entomology* 59 (1): 42–45. DOI:10.1093/jee/59.1.42.
- Hoban, S.M. *et al.* (2013). Bringing genetic diversity to the forefront of conservation policy and management. *Conserv. Genet. Resour.* 5, 593–598.
- Hohenlohe, P.A., Funk, W.C. & Rajora, O.P. (2021). Population genomics for wildlife conservation and management. *Mol. Ecol.* 30, 62–82.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A. & Grozinger, C.M. (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genom.* 14, 799, DOI:10.1186/1471-2164-14-799.
- Hopkins, B.K., Herr, C. & Sheppard, W.S. (2012). Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 1079–83.
- Hornitzky, M.A.Z. & Smith, L. (1998). Procedures for the culture of *Melissococcus pluton* from diseased brood and bulk honey samples. *Journal of Apicultural Research* 37 (4): 293–294. DOI:10.1080/00218839.1998.11100987.
- Hornitzky, M.A.Z. (1987). Prevalence of virus infections of honey bees in Eastern Australia. *J Apic Res* 26(3):181–185. DOI:10.1080/00218839.1987.11100756
- Hornitzky, M.A.Z. (2001). Literature Review of Chalkbrood, a Fungal Disease of Honeybees: A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation; Rural Industries Research and Development Corporation: Barton, Australia, ISBN 978-0-642-58370-3.
- Hrabák, J. & Martínek, K. (2007). Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Apicultural Research* 46 (3): 160–164. DOI:10.1080/00218839.2007.11101388.
- Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N. & Neov, B. (2020). Factors associated with honey bee colony losses: a mini-review. *Veterinary Sciences* 7, 166.
- Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N. & Neov, B. (2021). Honey bee colony losses: why are honey bees disappearing? *Sociobiology* 68 (1), e-5851. DOI:10.13102/SOCIOBIOLOGY.V68I1.5851.
- Huang, Q., *et al.* (2012). Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 297–302.
- Huang, W.F., Jiang, J.H., Chen, Y.W. & Wang, C.H. (2007). A *Nosema ceranae* Isolate from the Honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30–37
- Hünicken, P.L., Morales, C.L., Garcia, N. & Garibaldi, L.A. (2020). Insect pollination, more than plant nutrition, determines yield quantity and quality in apple and pear. *Neotrop Entomol* 49(4):525–532. DOI:10.1007/s13744-020-00763-0
- Hunt, G., Given, J.K., Tsuruda, J.M. & Andino, G.K. (2016). Breeding mite-biting bees to control Varroa. *Bee Cult.* 8, 41–47.
- Ibrahim, A., Reuter, G.S. & Spivak, M. (2007). Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. *Apidologie* 38, 67–76.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. (2023). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Acceso Junio 2023
- Ilyasov, R.A., Lee, M.I., Takahashi, J.I., Kwon, H.W. & Nikolenko, A.G. (2020). A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 3615–3621.
- Ilyasov, R.A., Poskryakov, A.V., Petukhov, A.V. & Nikolenko, A.G. (2015). Genetic differentiation of local populations of the dark European bee *Apis mellifera mellifera* L. in the Urals//*Russian Journal of Genetics*. 51 (7). P. 677–682. DOI:10.1134/S1022795415070042

- Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., & Zunino, P. (2011). Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria*, 47(181), 15–27.
- Invernizzi, C., Peñagaricano, F. & Tomasco, I.H. (2009). Intracolonia genetic variability in honeybee larval resistance to the chalkbrood and American foulbrood parasites. *Insectes Sociaux* 56, 233–240.
- Invernizzi, C., Zefferino, I., Santos, E., Sánchez, L. & Mendoza, Y. (2015). Multilevel assessment of grooming behavior against *Varroa destructor* in Italian and Africanized honey bees. *J. Apic. Res.* 54, 321–327. DOI:10.1080/00218839.2016.1159055
- Iorizzo, M., Letizia, F., Ganassi, S., Testa, B., Petrarca, S., Albanese, G., Di Criscio, D. & De Cristofaro, A. (2022). Recent Advances in the Biocontrol of Nosemosis in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *J. Fungi*, 8, 424. DOI:10.3390/jof8050424
- Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y.S., Qasim, M., Tayyab, M., Noman, A., Nisar, M.S., Khan, K.A., et al. (2021). Insect-Fungal-Interactions: A Detailed Review on Entomopathogenic Fungi Pathogenicity to Combat Insect Pests. *Microb. Pathog.* 159, 105122.
- Jabal-Uriel, C., Albarracin, V.N., Calatayud, J., Higes, M. & Martín-Hernaández, R. (2022). Age and Season Effect the Timing of Adult Worker Honeybee Infection by *Nosema ceranae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:823050. DOI:10.3389/fcimb.2021.823050
- Jack, C.J., Lucas, H.M., Webster, T.C., & Sagili, R.R. (2016). Colony Level Prevalence and Intensity of *Nosema Ceranae* in Honey Bees (*Apis Mellifera* L.). *PloS One* 11, 1–20. DOI: 10.1371/journal.pone.0163522
- Jamal, Z.A., Abou-Shaara, H.F., Qamer, S. et al. (2021). Future expansion of small hive beetles, *Aethina tumida*, towards North Africa and South Europe based on temperature factors using maximum entropy algorithm. *Journal of King Saud University - Science* 33, 101242.
- James, R.R. & Skinner, J.S. (2005). PCR Diagnostic Methods for *Ascosphaera* Infections in Bees. *J. Invert. Pathol.* 90, 98–103.
- James, R.R. & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 175–182
- Janmaat, A.F. & Winsto, M.L. (2000). Removal of *Varroa jacobsoni* infested brood in honey bee colonies with differing pollen stores. *Apidologie*, 31 (3): 377–385. DOI:10.1051/apido:2000129
- Jayaraj, R., Megha, P. & Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Review Article. Interdiscip Toxicol.* 9(3-4):90-100.
- Jensen, A.B., Aronstein, K., Flores, J.M., Vojvodic, S., Palacio, M.A. & Spivak, M. (2013). Standard Methods for Fungal Brood Disease Research. *J. Apic. Res.* 52, 1–20.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908
- Jiang, J., Ma, D., Zou, N., Yu, X., Zhang, Z., Liu, F. & Mu, W. (2018). Concentrations of imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*, 201, 159-167.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A. & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41:312-331. DOI:10.1051/apido/2010018
- Jones, C.M. & Brown, M.J.F. (2014). Parasites and genetic diversity in an invasive bumblebee. *J. Anim. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12235>
- Jordan, A., H. M. Patch, C. M. Grozinger, & V. Khanna. (2021). Economic Dependence and Vulnerability of United States Agricultural Sector on Insect-Mediated Pollination Service. *Environ. Sci. Technol.* 55: 2243–2253.
- Juan García, A., Picó, Y. & Font, G. (2003). Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Revista Toxicológica*, núm. 20.

- Kairo, G., Poquet, Y., Haji, H., Tchamitchian, S., Cousin, M., Bonnet, M., *et al.* (2017). Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(9), 2345-2351.
- Kamler, F., Titěra, D. & Kamler, M. (2011). Rozšíření, Patogeneze a Návrh Opatření Vchovech Včel Ohrožených Mikrosporidií *Nosema ceranae*, 2011; Závěrečná Zpráva za Rok; APIC: Arlington, VA, USA, p. 20.
- Kandemir, I., Kence, M., Sheppard, W.S. & Kence, A. (2006). Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. *J Api Res* 45:33–38
- Kang, Y., Blanco, K., Davis, T., Wang, Y. & DeGrandi-Hoffman, G. (2016). Disease dynamics of honeybees with *Varroa destructor* as parasite and virus vector. *Math. Biosci.* 275, 71–92.
- Kanissery, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O. & Alferez, F. (2019). Glyphosate: its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. *Plants* 8 (11), 499
- Karahan, A., Cakmak, I., Hranitz, J.M., Karaca, I. & Wells, H. (2015). Sublethal imidacloprid effects on honey bee flower choices when foraging. *Ecotoxicology* 24, 2017–2025.
- Karam, M.A., Ramírez, G., Bustamante Montes, P. & Galván, J.M. (2004). Plaguicidas y salud de la población, *Ciencia ergo sum*, núm. 3, vol. 11, pp. 246-254.
- Karise, R., Raimets, R., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Pihlik, P., Keres, I., Williams, I.H., Viinalass, H. & Meand, M. (2017). Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? *Chemosphere* 188, 389–396.
- Kathe, E., Seidelmann, K., Lewkowski, O., Le Conte, Y. & Erler, S. (2021). Changes in chemical cues of *Melissococcus plutonius* infected honey bee larvae. *Chemoecology* 31:189–200 DOI:10.1007/s00049-021-00339-3
- Keeler, A.M., Rose-Person, A. & Rafferty, N.E. (2021). From the ground up: Building predictions for how climate change will affect belowground mutualisms, floral traits, and bee behavior. *Climate Change Ecology* 1, 100013.
- Keeling, P. & Fast, N. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56, 93–116.
- Kent, C.F., Issa, A., Bunting, A.C. & Zayed, A. (2011). Adaptive evolution of a key gene affecting queen and worker traits in the honey bee, *Apis mellifera*. *Molecular Ecology*. Vol 20, Issue 24, 5226-5235. DOI:10.1111/j.1365-294X.2011.05299.x
- Kent, R.B. (1988). The Introduction and Diffusion of the African Honeybee in South America. *Yearbook of the Association of Pacific Coast Geographers*, 50(1), 21–43. DOI:10.1353/pcg.1988.0009
- Keohane, E.M. & Weiss, L.M. (1999). The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*; Wittner, M., Weiss, L.M., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, pp. 196–224. DOI:10.1128/9781555818227.ch6.
- Kerr, W.E. (1967). The history of the introduction of Africanized honey bees to Brazil. *South African Bee Journal*, 39, 3-5
- Kerr, W.E., Leon Del Rio, S. & Barrionuevo, M.D. (1982). The southern limits of the distribution of the Africanized honey bee in South America. *American Bee Journal*, 121, 196-198
- Kevan, P.G., Hannan, M.A., Ostiguy, N. & Guzman-Novoa, E. (2006). A summary of the varroa-virus disease complex in honey bees. *Am. Bee J.* 146, 694–697.
- Kevill, J.L., Highfield, A., Mordecai, G.J., Martin, S.J. & Schroeder, D.C. (2017). ABC assay: Method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees. *Viruses* 9, 314.
- Khalifa, S.A.M., Elshafiey, E.H., Shetaia, A.A. *et al.* (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects* 12, 688
- Khezri, M., Moharrami, M., Modirrousta, H., Torkaman, M., Rokhzad, B. & Khanbabaie, H. (2018). Prevalence of American foulbrood in asymptomatic apiaries of Kurdistan, Iran. *Vet. World* 11, 281–285.

- Kim, I-H., Kim, D-J., Gwak, W-S. & Woo, S-D. (2020). Increased survival of the honey bee *Apis mellifera* infected with the microsporidian *Nosema ceranae* by effective gene silencing. Arch Insect Biochem Physiol. e21734. DOI:10.1002/arch.21734
- King, A.M., Adams, M.J., Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J. (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego
- Klee, J., Besana A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruze J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I. & Paxton R.J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 96: 1–10. DOI:10.1016/j.jip.2007.02.014.
- Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C. *et al.* (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc R Soc B Biol Sci. 274:303–13.
- Kluser, S. & Peduzzi, P. (2007). Global pollinator decline: a literature review. Geneva: UNEP/GRID.
- Koch, H. & Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(48), 19288-19292.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. & Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci USA 86, 6196-6200
- Kono, Y. & Kohn, J.R. (2015). Range and frequency of Africanized honey bees in California (USA) PLoS One, 10(9), e0137407. DOI:10.1371/journal.pone.0137407
- Korst, P.J.A.M. & Velthuis, H.H. (1982). The nature of trophallaxis in honeybees. Insectes Sociaux 2: 209-221.
- Kotkova, M. *et al.* (2013). Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. PLoS One 8, e60941
- Kraus, F.B. & Page, R.E. (1998). Parasites, Pathogens and Polyandry in Social Insects. Am. Nat. 151, 383–391.
- Kraus, F.B., Franck, P. & Vandame, R. (2007). Asymmetric introgression of African genes in honey bee populations (*Apis mellifera* L.) in central Mexico. Heredity, 99, 233–240. DOI:10.1038/sj.hdy.6800988
- Krichilsky, E., Centrella, M., Eitzer, B., Danforth, B., Poveda, K. & Grab, H. (2021). Landscape composition and fungicide exposure influence host-pathogen dynamics in a solitary bee. Environ. Entomol. 50 (1), 107–116. DOI:10.1093/ee/nvaa138
- Kritsky, G. (2017). Beekeeping from antiquity through the middle ages. Annu. Rev. Entomol. 62, 249–264
- Krongdang, S. *et al.* (2017). Multilocus sequence typing, biochemical and antibiotic resistance characterizations reveal diversity of North American strains of the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. PLoS One 12 (5): e0176831–e0176831. DOI:10.1371/journal.pone.0176831.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G. & Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. PLoS One 7. DOI:10.1371/journal.pone.0029268
- Krupke, C.H., Obermeyer, J.L. & Bledsoe, L.W. (2016). Corn Insect Control Recommendations– 2016. Purdue University Extension Publication E-219-W. <https://extension.entm.purdue.edu/publications/E-219.pdf>
- Kulhanek, K., *et al.* (2017). A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. J. Apicult. Res. 56: 328–340.
- Kurze, C., *et al.* (2015). *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. PLoS ONE 10, e0140174.

- Kurze, C., *et al.* (2016a). *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitol. Res.* 115, 2381–2388.
- Kurze, C., Le Conte, Y., Kryger, P., Lewkowski, O., Müller, T. & Moritz, R.F.A. (2018). Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. *Journal of Invertebrate Pathology* 154 (2018) 1–4. DOI:10.1016/j.jip.2018.03.008
- Kurze, C., Routtu, J. & Moritz, R.F.A. (2016b). Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*. DOI:10.1016/j.zool.2016.03.007
- Kyriakopoulou, K., Kandris, I., Pachiti, I., Kasiotis, K.M., Spyropoulou, A., Santourian, A., Kitromilidou, S., Pappa, G., Glossioti, M. (2017). Collection and Analysis of Pesticide Residue Data for Pollen and Nectar. EFSA supporting publication:EN-1303. 96pp.
- L'Arrivee, J.C.M. (1965). Sources of *Nosema* infection. *Am. Bee J.* 105, 264.
- Laate, E.A., Emunu, J.P., Duering, A. & Lynae, O. (2020). Potential Economic Impact of European and American Foulbrood on Alberta's Beekeeping Industry. <https://open.alberta.ca/dataset/029a345b-8621-4986-ad78-7fc6ddcd8b17/resource/25f7b78d-a359-428c-9648-9175c3634720/download/af-potential-economic-impact-european-american-foulbroodon-albertas-beekeeping-industry.pdf>
- Laitinen, P., Ramo, S. & Siimes, K. (2007). Glyphosate translocation from plants to soil—does this constitute a significant proportion of residues in soil? *Plant Soil*; 300(1):51–60.
- Laitinen, P., Ramo, S., Nikunen, U., Jauhiainen, L., Siimes, K. & Turtola, E. (2009). Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant Soil*; 323(1):267–83.
- Laitinen, P., Siimes, K., Eronen, L., Ramo, S., Welling, L., Oinonen, S., *et al.* (2006). Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils. *Pest Manag Sci.*; 62(6):473–91. DOI:10.1002/ps.1186 PMID:16628542
- Laitinen, P., Siimes, K., Ramo, S., Jauhiainen, L., Eronen, L., Oinonen, S., *et al.* (2008). Effects of Soil Phosphorus Status on Environmental Risk Assessment of Glyphosate and Glufosinate-Ammonium. *J Environ Qual.* 37(3):830–8. DOI:10.2134/jeq2007.0256 PMID:18453404
- Lanutti, L., Gonzalez, F.N., Dus Santos, M.J., Florin-Christensen, M. & Schnittger, L. (2022). Molecular detection and differentiation of arthropod, fungal, protozoan, bacterial and viral pathogens of honeybees. *Vet. Sci.* 9, 221. DOI:10.3390/vetsci9050221
- Lanzi, G., de Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C.E., Lavazza, A., *et al.* (2006). Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* 80, 4998–5009
- Larson, J.L., Redmond, C.T. & Potter, D.A. (2013). Assessing insecticide hazard to bumble bees foraging on flowering weeds in treated lawns. *PLoS One.* 8(6): e66375. DOI:10.1371/journal.pone.0066375 PMID:23776667
- Laurino, D., Porporato, M., Patetta, A. & Manino, A. (2011). Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: Laboratory tests. *Bull. Insectology* 64, 107–113.
- Lautenbach, S., Seppelt, R., Liebscher, J. & Dormann, C.F. (2012). Spatial and Temporal Trends of Global Pollination Benefit. *PLoS ONE* 7, e35954.
- Le Conte, Y. & Navajas, M. (2008). Climate change: Impact on honey bee populations and diseases. *Technical Review of the Office International Des Epizooties*, 27(2), 499-510
- Le Conte, Y., Alaux, C., Martin, J.F., Harbo, J.R., Harris, J.W., Dantec, C., *et al.* (2011). Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): Transcriptome analysis of Varroa hygienic behaviour. *Insect Mol Biol.* 20(3):399–408.
- Le Conte, Y., Arnold, G. & Desenfant, P.H. (1990). Influence of brood temperature and hygrometry variation on the development of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Environ. Entomol.*, 19, 1780–1785.

- Le Conte, Y., De Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J.-C. & Bécard, J.-M. (2007). Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie* 38, 566–572. DOI:10.1051/apido:2007040.
- Le Conte, Y., Ellis, M. & Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie* 41, 353–363. DOI:10.1051/apido/2010017.
- Le Conte, Y., Meixner, M., Brandt, A., Carreck, N., Costa, C., Mondet, F. & Büchler, R. (2020). Geographical Distribution and Selection of European Honey Bees Resistant to *Varroa destructor*. *Insects*, MDPI 11, 34 p. ff10.3390/insects11120873ff. fhal-03079510.
- Lechenet, M., Dessaint, F., Py, G., Makowski, D. & Munier-Jolain, N. (2017). Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nat. Plants* 3, 17008. DOI:10.1038/nplants.2017.8
- Leclercq, G., Gengler, N. & Francis, F. (2018). How human reshaped diversity in honey bees (*Apis mellifera* L.): a review. *Entomologie faunistique-Faunistic Entomology*.
- Leclercq, G., Pannebakker, B., Gengler, N., Nguyen, B.K & Francis, F. (2017). Drawbacks and benefits of hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.): A review. *Journal of Apicultural Research* 56, 366–75
- Lecocq, A., Jensen, A.B., Kryger, P. & Nieh, J.C. (2016). Parasite Infection Accelerates Age Polyethism in Young Honey Bees. *Sci. Rep.* 6, 1–11. DOI: 10.1038/srep22042
- Ledoux, M.L., Hettiarachchy, N., Yu, X., Howard, L. & Sun-Ok, L. (2020). Penetration of glyphosate into the food supply and the incidental impact on the honey supply and bees. *Food Control* 109, 106859
- Lee, K.V., Moon, R.D., Burkness, E.C., Hutchison, W.D. & Spivak, M. (2010). Practical Sampling Plans for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies and Apiaries. *J. Econ. Entomol.* 103, 1039–1050
- Leonard, S.P. *et al.* (2020). Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens. *Science* 367, 573–576
- Leska, A., Nowak, A., Miśkiewicz, K. & Rosicka-Kaczmarek, J. (2022). Binding and Detoxification of Insecticides by Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Honeybee (*Apis mellifera* L.) Environment—An In Vitro Study. *Cells* 11,743. DOI:10.3390/cells11233743
- Leska, A., Nowak, A., Nowak, I. & Górczyska, A. (2021). Effects of Insecticides and Microbiological Contaminants on *Apis mellifera* Health. *Molecules* 26, 5080. DOI:10.3390/molecules26165080
- Levin, S., Sela, N., Erez, T., Nestel, D., Pettis, J., Neumann, P. & Chejanovsky, N. (2019). New viruses from the ectoparasite mite *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Viruses*, 11: 1-15. DOI:10.3390/v11020094
- Levitt, A.L., Singh, R., Cox-Foster, D.L., Rajotte, E., Hoover, K., Ostiguy, N. & Holmes, E.C. (2013). Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Research* 176(1-2):232-240. DOI:10.1016/j.virusres.2013.06.013
- Lewkowski, O. & Erler, S. (2019). Virulence of *Melissococcus plutonius* and secondary invaders associated with European foulbrood disease of the honey bee. *MicrobiologyOpen* 8:e649. DOI:10.1002/mbo3.649
- Li, J., Wang, T., Evans, J.D., Rose, R., Zhao, Y., Li, Z., Li, J., Huang, S., Heerman, M., Rodríguez-García, C., Banmekea, O., Brister, J.R., Hatcher, E.L., Cao, L., Hamilton, M. & Chen, Y. (2019). The phylogeny and pathogenesis of sacbrood virus (SBV) infection in European honey bees, *Apis mellifera*. *Viruses* 14; 11(1):61. DOI:10.3390/v11010061
- Li, W., Chen, Y. & Cook, S.C. (2018). Chronic *Nosema ceranae* Infection Inflicts Comprehensive and Persistent Immunosuppression and Accelerated Lipid Loss in Host *Apis mellifera* Honey Bees. *Int. J. Parasitol.* 48, 433–444. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.11.004
- Li, W., Evans, J. D., Li, J., Su, S., Hamilton, M. & Chen, Y. (2017). Spore Load and Immune Response of Honey Bees Naturally Infected by *Nosema ceranae*. *Parasitol. Res.* 116, 3265–3274. DOI: 10.1007/s00436-017-5630-8
- Lin, Z., Page, P., Li, L., Qin, Y., Zhang, Y., Hu, F., *et al.* (2016). Go east for better honey bee health: *Apis cerana* is faster at hygienic behavior than *A. mellifera*. *PloS one*, 11(1), 100-107.

- Lin, Z., Qin, Y., Page, P. *et al.* (2018). Reproduction of parasitic mites *Varroa destructor* in original and new honeybee hosts. *Ecology and Evolution* 8, 2135–45.
- Lin, Z., Shen, S., Wang, K., & Ting, J.I. (2023a). Biotic and abiotic stresses on honeybee health. *Integrative Zoology* 0: 1–16. DOI: 10.1111/1749-4877.12752
- Lin, Z., Zhang, N., Wang, Z. *et al.* (2022). Acute and chronic viruses mediated by an ectoparasite targeting different developmental stages of honeybee (*Apis mellifera* and *Apis cerana*) brood. *Frontiers in Veterinary Science* 9, 951159.
- Lin, Z., Zhu, Z., Zhuang, M., Wang, Z., Zhang, Y., Gao, F., Niu, Q. & Ji, T. (2023b). Effects of local domestication warrant attention in honey bee population genetics. *Science Advances*, 9. DOI:10.1126/sciadv.ade7917
- Lindström, A. & Fries, I. (2005). Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *J Apic Res.* 44:82–86.
- Lindström, A., Korpela, S. & Fries, I. (2008). Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie* 39 (5): 515–522. DOI:10.1051/apido:2008032.
- Little, C., Shutler, D. & Williams, G. (2016). Associations among *Nosema* spp. fungi, *Varroa destructor* mites, and chemical treatments in honeybees, *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* DOI:10.1080 /00218839.2016.1159068.
- Little, C.M., Shutler, D., & Williams, G.R. (2015). Associations among *Nosema* spp. fungi, *Varroa destructor* mites, and chemical treatments in honey bees, *Apis mellifera* . *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 378–385. DOI:10.1080/00218839.2016.1159068
- Loader, C.E. & Anderson, H.J. (1981). Pyrrole chemistry. XXIII. The cyanation of substituted pyrroles with chlorosulfonyl isocyanate (CSI). New syntheses of pyrrole3-carbonitriles. *Can. J. Chem.* 59, 2673–2683
- Lobo Segura, J.A. (2000). Highly polymorphic DNA markers in Africanized honey bee populations in Costa Rica. *Genetics and Molecular Biology*, 23(2), 317–322. DOI:10.1590/S1415-47572000000200013
- Locke, B. & Fries, I. (2011). Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie*. DOI:10.1007/s13592-011-0029-5.
- Locke, B. (2016). Natural Varroa mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie* 47, 467–82. DOI:10.1007/s13592-015-0412-8.
- Locke, B., Le Conte, Y., Crauser, D. & Fries, I. (2012). Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations *Ecology and Evolution* 2(6): 1144–1150 DOI:10.1002/ece3.248
- Locke, S. & Cobey, S. (1986). The Africanized Bee: A Tour of Central America. *American Bee Journal* 126(6): 434-440.
- Lodesani, M. & Costa, C. (2003). Bee breeding and genetics in Europe. *Bee World*, 84, 69–85.
- Lodesani, M., Crailsheim, K. & Moritz, R.F.A. (2002). Effect of some characters on the population growth of mite *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* L colonies and results of a bi-directional selection. *J. Appl. Entomol.*, 126, 130–137.
- Lodesani, M., Crailsheim, K. & Moritz, R.F.A. (2002). Effect of some characters on the population growth of mite *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* L colonies and results of a bi-directional selection. *J. Appl. Entomol.* 126, 130–137.
- Long, E.Y. & Krupke, C.H. (2016). Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. *Nat. Commun.* 7, 1–12. DOI:10.1038/ncomms11629
- Lopera, M., Peñuela, G., Domínguez, M. & Mejía, G. (2005). Evaluación de la degradación del plaguicida Clorpirifós en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (33), 58-69.
- Lopes, A.R., Martín-Hernández, R., Higes, M., Segura, S.K., Henriques, D. & Pinto, M.A. (2022). Colonisation Patterns of *Nosema ceranae* in the Azores Archipelago. *Vet. Sci.* 9, 320. DOI:10.3390/vetsci9070320

- Louveaux, J. (1973). The acclimatization of bees to a heather region. *Bee world* 54, 105–111. DOI:10.1080/0005772x.1973.11097464
- Louveaux, J., Albisetti, M., Delangue, M. & Theurkauff, J. (1966). Les modalités de l'adaptation des abeilles (*Apis mellifica* L.) au milieu naturel. *Ann. Abeille*, 9 (4), 323–350.
- Lu, Y.H., Qiu, F., Feng, H.Q., Li, H.B., Yang, Z.C., Wyckhuys, K.A.G., *et al.* (2008). Species composition and seasonal abundance of pestiferous plant bugs (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in China. *Crop Prot*, 7: 465–472.
- Lucia, M., Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H. & Abrahamovich, A.H. (2014). First detection of deformed wing virus in *Xylocopa augusti* larvae (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *J. Apic. Res.* 53 (4), 466–468
- Lundin, O., Rundlof, M., Smith, H.G., Fries, I. & Bommarco, R. (2015). Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS One* 10, e0136928. DOI:10.1371/journal.pone.0136928
- Lupi, L., Bedmar, F., Puricelli, M., Marino, D., Aparicio, V.C., Wunderlin, D., *et al.* (2019). Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere* 225:906–14.
- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., Brasesco, C., De Jong, D., Message, D., Weinstein Texeira, E., Principal, J., Barrios, C., Ruffinengo, S., Rodríguez Da Silva, S. & Eguaras, M. (2016). Honeybee health in South America. *Apidologie*. 47: 835–854. DOI:10.1007/s13592-016-0445-7.
- Maggi, M., Medici, S., Quintana, S., Ruffinengo, S., Marcangeli, J., Martinez, P.G., Fuselli, S. & Eguaras, M. (2012). Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Experimental and Applied Acarology* 56, 309–318. DOI:10.1007/s10493-012-9526-0.
- Maggi, M., Ruffinengo, S., Damiani, N., Sardella, N. & Eguaras, M. (2009). A First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp. Appl. Acarol.* 47 (4), 317–320.
- Maggi, M., Ruffinengo, S., Negri, P., Brasesco, C., Medici, S., Quintana, S., Szawarski, N., Gimenez-Martinez, P., De Piano, F., Revainera, P., Mitton, G., & Eguaras, M. (2013). The status of bee health and colony losses in Argentina. In: *Honeybees: Foraging Behavior, Reproductive Biology and Diseases*. Nova Publishing Group.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Damiani, N. *et al.* (2009). First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp Appl Acarol* 47, 317–320. DOI:10.1007/s10493-008-9216-0
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I. & Eguaras, M.J. (2011). Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitol. Res.* 108, 815–821.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P. *et al.* (2010). Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitol Res* 107, 1189–1192. DOI:10.1007/s00436-010-1986-8
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P., Brasesco, C., Medici, S., Quintana, S., Szawarski, N., Gimenez Martínez, P., De piano, F., Revainera, P., Mitton, G. & Eguaras, M.J. (2014). The status of honeybee health and colony losses in Argentina. In: *Honeybee* ISBN: 978-1-62948-660-4.
- MAGyP - Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía. (2019). <https://www.magyp.gob.ar/monitorpreciosmiel/>
- Maienfisch, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, W., Rindlisbacher, A., Senn, R., Steinemann, A. & Widmer, H. (2001). Chemistry and biology of thiamethoxam: A second generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* 57, 906–913. DOI:10.1002/ps.365
- Maini, R. & Aggarwal, H. (2010). A comprehensive review of image enhancement techniques. *arXiv:1003.4053*.
- Maini, S., Medrzycki, P. & Porrini, C. (2010). The puzzle of honey bee losses: a brief review. *B Insectol.* 63:153–160.

- Maiolino, P., Iafigliola, L., Rinaldi, L., De Leva, G., Restucci, B. & Martano, M. (2014). Histopathological Findings of the Midgut in European Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Naturally Infected by *Nosema* Spp. Vet. Med. Anim. Sci. 2:4. doi: 10.7243/2054-3425-2-4
- Malaspina, O. & Stort, A.C. (1983). DDT tolerance of Africanized bees, Italian bees (*Apis mellifera ligustica*) and their F1 hybrids (Hymenoptera: Apidae). J. Kans. Entomol., 56, 74–79.
- Mallinger, R.E., Gaines-Day, H.R. & Gratton, C. (2017). Do managed bees have negative effects on wild bees? PLOS ONE. 12: e0189268.
- Malone, L.A., Giacon, H.A. & Newton, M.R. (1995). Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. Apidologie 26, 495–502.
- Manley, R. *et al.* (2019). Knock-on community impacts of a novel vector: Spillover of emerging DWV-B from Varroa-infested honeybees to wild bumblebees. Ecol. Lett. DOI:10.1111/ele.13323
- Manley, R., Boots, M. & Wilfert, L. (2015). Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. Journal of Applied Ecology 52(2):331-340. DOI:10.1111/1365-2664.12385.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E. & Sela, I. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intraand inter-species recombination. J Gen Virol 88(12):3428–3438. DOI:10.1099/vir.0.83284-0
- Marañón, P. (2015). Manejo y Uso de los plaguicidas agrícolas entre los horticultores en el valledel río Chillón-Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. (Tesis de pregrado)
- Marcangeli, J., García, M. & Distéfano, L. (2005). Programa sanitario apícola del partido de Mar Chiquita. Relevamiento de las enfermedades de abejas. XVII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Mar del Plata, Argentina
- Mariani, F., Maggi, M., Porrini, M., Fuselli, S., Caraballo, G., Brasesco, C., Barrios, C., Principal, J. & Eguaras, M. (2012). Parasitic interactions between *Nosema spp.* and *Varroa destructor* in *Apis mellifera* colonies. Zootec. Trop. 30 (1): 81–90. Available in: <http://www.bioline.org.br/abstract?zt12009>.
- Martin, S.J. & Brettell, L.E. (2019). Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. Annu. Rev. Virol. 6, 49–69.
- Martin, S.J. & Medina, L.M. (2004). Africanized honeybees have unique tolerance to Varroa mites. Trends Parasitol. 20, 112–114.
- Martin, S.J. (1995). Ontogenesis oh the mite *Varroa jacobsoni* oud. In worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Exp. Appl. Acarol. 19, 199-210.
- Martin, S.J. (1998). A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Ecol. Model. 109 (109), 267–281. DOI:10.1016/S0304-3800(98)00059-3.
- Martin, S.J. (2001). The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. J Appl Ecol 38(5):1082–1093. DOI:10.104 6/j.1365-2664.2001.00662.x
- Martin, S.J., Ball, B.V. & Carreck, N.L. (2010). Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated and acaricide-treated colonies *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Journal of Apicultural Research 49: 72- 79. DOI:10.3896/IBRA.1.49.1.10
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S. & Schroeder, D.C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. Science 336(6086): 1304–1306. DOI:10.1126/science.1220941
- Martín-Hernández, R. *et al.* (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. Appl. Environ. Microbiol. 75, 2554–2557. DOI:10.1128/AEM.02908-08
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., GarcíaPalencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., Soroker, V. & Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. EnvironmentalMicrobiology, 20(4), 1302–1329. DOI:10.1111/1462-2920.14103

- Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A. & Higes, M. (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*. *Environ Microbiol* 14:2127–2138. DOI:10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x
- Martín-Hernández, R., *et al.* (2017). Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS ONE* 12.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A., Garrido-Bailon, E. & Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 73, 6331–6338
- Masaquiza Moposita, D., Curbelo Rodríguez, L.M. & Arenal Cruz, A. (2020). Africanización de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.). *Revisión de Literatura. Agrisost Vol. 26, No. 2, 1-13. ISSN-e: 1025-0247*
- Mascena Peixoto, C., França, S.O., da Cruz Mercês, C., Correia-Oliveira, M.E. & de Carvalho, C.A.L. (2024). Occurrence of pathogenic viruses in Africanized honey bees in Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 63(1), 128–135. DOI:10.1080/00218839.2021.1962111
- Masterman, R., Ross, R., Mesce, K. & Spivak, M. (2001). Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.* 187, 441–452.
- Matheson, A. (1993). World bee health report. *Bee World* 74 (4): 176–212. DOI:10.1080/00057 72X.1993.11099183.
- Matheson, A. (1996). World bee health update. *Bee World* 77, 45–51.
- Matheson, A., & Reid, M. (1992). Strategies for the prevention and control of American foulbrood. Parts I, II, and III. *American Bee Journal* 132: 399–402; 133, 47 1–475; 143, 534–547.
- Mathis, A. (2000). Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *International Journal of Parasitology*, 30: 795–804.
- Matthijs, S., De Waele, V., Vandenberge, V., Verhoeven, B., Evers, J., Brunain, M., Saegerman, C., De Winter, P.J.J., Roels, S., de Graaf, D.C., *et al.* (2020). Nationwide Screening for Bee Viruses and Parasites in Belgian Honey Bees. *Viruses*, 12, 890, DOI:10.3390/v12080890.
- Mattila, H.R. & Seeley, T.D. (2007). Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science*, 317(5836), 362–364.
- Maucourt, S., Fortin, F., Robert, C. & Giovenazzo, P. (2020). Genetic parameters of honey bee colonies traits in a Canadian selection program. *Insects*, 11, 587.
- Maxfield-Taylor, S.A., Mujic, A.B. & Rao, S. (2015). First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: eurotiomycetes: Ascosphaerales) in adult bumble bees. *PLoS One* 10 (4), e0124868. DOI:10.1371/journal.pone.0124868.
- Mayack, C. & Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* 100, 185–188.
- Mayack, C. & Naug, D. (2010). Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J Insect Physiol* 56, 1572–1575.
- Mayack, C., Macherone, A., Zaki, A.G., Filiztekin, E., Ozkazanc, B., Koperly, Y., Schick, S.J., Eppley, E.J., Deb, M., Ambiel, N., Schafsnitz, A.M. & Broadrup, R.L. (2022). Environmental exposures associated with honey bee health. *Chemosphere*. DOI:10.1016/j.chemosphere.2021.131948
- Mazé-Guilmo, E., Blanchet, S., McCoy, K.D. & Loot, G. (2016). Host dispersal as the driver of parasite genetic structure: a paradigm lost? *Ecol. Lett.* 19, 336–347. DOI:10.1111/ele.12564.
- Mazepa, C.I., Salgado Laurenti, C.R. & Maggi, M.D. (2022). Evolución del estado sanitario en colmenas de *Apis mellifera* L. bajo distintas condiciones de manejo y su relación con el aporte nutricional del polen. *Agrotecnia* 32: 34-56. DOI:10.30972/agr.0326339 ISSN: 0328 - 4077 (impreso) ISSN: 2545 - 8906 (on-line)

- Mcdermott, A. (2021). To understand the plight of insects, entomologists look to the past. PNAS 118, e2018499117.
- McKee, B.A. *et al.* (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. Apidologie 34: 19–27. DOI:10.1051/apido:2002047.
- McMahon, D.P., Fürst, M.A., Caspar, J., Theodorou, P., Brown, M.J.F. & Paxton, R.J. (2015). A sting in the spit: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. J. Anim. Ecol. 84, 615–624.
- McMahon, D.P., Natsopoulou, M.E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M.J.F., Gogol-Döring, A. & Paxton, R.J. (2016). Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. Proc. Royal Soc. B Biol. Sci. 283, 20160811
- McMenamin, A.J. & Flenniken, M.L. (2018). Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. Current Opinion in Insect Science 26:120-129. DOI:10.1016/j.cois. 2018.02.009
- McMenamin, A.J. & Genersch, E. (2015). Honey bee colony losses and associated viruses. Current Opinion in Insect Science 8:121-129. DOI: 10.1016/j.cois.2015.01.015.
- McNally, L.C. & Schneider, S.S. (1992a). Factors influencing seasonal absconding in colonies of the African honey bee, *Apis mellifera scutellata*. Insectes Sociaux, 39, 403–423. DOI:10.1007/BF01240624
- McNally, L.C. & Schneider, S.S. (1992b). Seasonal cycles of growth, development and movement of the African honey bee, *Apis mellifera scutellata*, in Africa. Insectes Sociaux, 39, 167–179
- McNally, L.C. & Schneider, S.S. (1996). Spatial distribution and nesting biology of colonies of the African honey bee *Apis mellifera scutellata* (Hymenoptera: Apidae) in Botswana, Africa. Environmental Entomology, 25, 643–652. DOI:10.1093/ee/25.3.643
- Meana, A., Llorens-Picher, M., Euba, A., Bernal, J.L., Bernal, J., Garcia-Chao, M., Dagnac, T., Castro-Hermida, J.A., GonzalezPorto, A.V., Higes, M. & Martin-Hernández, R. (2017). Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. Spanish Journal of Agricultural Research, 15 (1): e0501. DOI:10.5424/sjar/2017151-9652
- Medina-Flores, C.A., Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M.M., Aréchiga-Flores, C.F. & López-Carlos, M.A. (2014). Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. Gen. Mol. Res., 13, 7282–7293. DOI:10.4238/2014.February.21.10.
- Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L.P., Chauzat, M.P., Claßen, C., Colin, M.E., Dupont, T., Girolami, V., Johnson, R., Le Conte, Y., Lückmann, J., Marzaro, M., Pistorius, J., Porrini, C., Schur, A., Sgolastra, F., Simon Delso, N., van der Steen, J.J.M., Wallner, K., Alaux, C., Biron, D.G., Blot, N., Bogo, G., Brunet, J.-L., Delbac, F., Diogon, M., El Alaoui, H., Provost, B., Tosi, S. & Vidau, C. (2013). Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*, Journal of Apicultural Research, 52:4, 1-60, DOI:10.3896/IBRA.1.52.4.14
- Meixner, M., Francis, R., Gajda, A., Kryger, P., Andonov, S., Uzunov, A., Topolska, G., Costa, C., Amiri, E., Berg, S., Bienkowska, M., Bouga, M., Büchler, R., Dyrba, W., Gurgulova, K., Hatjina, F., Ivanova, E., Janes, M., Kezic, N., Korpela, S., Le Conte, I., Panasiuk, B., Pechhacker, H., Tsoktouridis, G., Vaccari, G., Wilde, J. (2014). Occurrence of parasites and pathogens in honeybee colonies used in a Europe an genotype-environment interactions experiment. J. Apic. Res. 53 (2): 215–229. DOI:10.3896 /IBRA.1.53.2.04.
- Meixner, M.D., Costa, C., Kryger, P., Hatjina, F., Bouga, M., Ivanova, E. & Büchler, R. (2010). Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. J. Apic. Res., 49, 85–92.
- Meixner, M.D., Pinto, M.A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E. & Fuchs, S. (2013). Standard methods for characterizing subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. J Apic Res. 52: 1–28. DOI:10.3896/IBRA.1.52.4.05
- Mena-Rodríguez, E., Ortega-Cuadros, M., Merini, L., Melo-Ríos, A. & Tofiño-Rivera, A. (2018). Efecto de agroinsumos y aceites esenciales en el suelo de hortalizas en el Caribe colombiano. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria, Mosquera (Colombia), 19(1):103-124
- Mendoza, Y., Antúnez, K., Branchiccela, B., Anido, M., Santos, E. & Invernizzi, C. (2014). *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. Apidologie 45, 224–234.

- Mendoza, Y., Gramajo, E., Invernizzi, C. & Tomasco, I. H. (2020). Mitochondrial haplotype analyses of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in Uruguay. *Systematic and Applied Acarology*, 25: 1526-1529.
- Mendoza, Y., Harriet, J., Campa, J., Katz, H., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S. & Invernizzi, C. (2013). Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia* (Uruguay), 17(1), 108-113. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482013000100013&lng=es&tlng=es.
- Message, D., Teixeira, E.W., & De Jong, D. (2012). Situação da sanidade das abelhas no Brasil. In: Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade. Orgs. V.L. Imperatriz-Fonseca, D.A.L. Canhos, D.A. Alves, A.M. Saraiva - São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo. <https://repositorio.usp.br/item/002304064>
- Miao, W., Junlong, B., Lei, W., Danyin, Z., Xiaotian, M., Wengui, L., Wenzheng, Z., Gefen, Y., Jianping, L. & Shaoyu, H. (2016). Prevalence of four common bee RNA viruses in eastern bee populations. *J Veterinar Sci Technol* 7:1. DOI:10.4172/2157-7579.1000284
- Michener, C.D. (1975). The Brazilian bee problem. *Annu. Rev. Entomol.*, 20, 399-416.
- Mihara, T., Koyano, H., Hingamp, P., Grimsley, N., Goto, S. & Ogata, H. (2018). Taxon Richness of “Megaviridae” Exceeds those of Bacteria and Archaea in the Ocean. *Microbes Environ.* 33, 162–171.
- Mikheyev, A.S., Tin, M.M.Y., Arora, J., & Seeley, T.D. (2015). Museum samples reveal rapid evolution by wild honey bees exposed to a novel parasite. *Nat. Commun.* 6, 1–8.
- Milani, N. (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30, 229–234. DOI:10.1051/apido:19990211.
- Milbrath, M. (2021). Chapter 22: Honey Bee Bacterial Diseases. In: *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*, First Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Milone, J.P. & Tarpy, D.R. (2021). Effects of developmental exposure to pesticides in wax and pollen on honey bee (*Apis mellifera*) queen reproductive phenotypes. *Scientific Reports* 11:1020. DOI:10.1038/s41598-020-80446-3
- Minnameyer, A., Strobl, V., Bruckner, S., Camenzind, D.W., Van Oystaeyen, A., Wäckers, F., Williams, G.R., Yañez, O., Neumann, P. & Straub, L. (2021). Eusocial insect declines: Insecticide impairs sperm and feeding glands in bumblebees, *Science of The Total Environment*, Volume 785, 146955, ISSN 0048-9697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2021.146955.
- Miranda, G.R.B., Raetano, C.G., Silva, E., Daam, M.A. & Cerejeira, M.J. (2011). Environmental Fate of Neonicotinoids and Classification of Their Potential Risks to Hypogean, Epygean, and Surface Water Ecosystems in Brazil. *Hum. Ecol. Risk Assess.* An Int. J. 17, 981–995. DOI:10.1080/10807039.2011.588159
- Mitchell, E.A.D., Mulhauser, B., Mulot, M., Mutabazi, A., Glauser, G. & Aebi, A. (2017). A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, 358, 109–111.
- Mitton, G., Meroi Arcerito, F., Cooley, H., Fernández de Landa, G., Eguaras, J., Ruffinengo, S., & Maggi, M. (2022). More than sixty years living with *Varroa destructor*: a review of acaricide resistance, *International Journal of Pest Management*. DOI:10.1080/09670874.2022.2094489
- Mitton, G.A., Szawarski, N., Ramos, F., Fuselli, S., Meroi Arcerito, F.R., Eguaras, M.J., *et al.* (2018). *Varroa destructor*: when reversion to coumaphos resistance does not happen. *Journal of Apicultural Research*, 57(4), 536–540. DOI:10.1080/00218839.2018.1475038
- Mockel, N., Gisder, S. & Genersch, E. (2011). Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. *J Gen Virol* 92(2):370–377. DOI:10.1099/vir.0.025940-0
- Moffett, J.O., Makin, D.L., Andre, T. & Melition Fierro, M. (1987). The Africanized Honeybee in Chiapas, Mexico. *American Bee Journal* 127(7): 517-519.
- Mogren, C.L. & Lundgren, J.G. (2016). Neonicotinoid-contaminated pollinator strips adjacent to cropland reduce honey bee nutritional status. *Sci. Rep.* 6:29608. DOI:10.1038/srep29608

- Molina, A., Guzman, E., Message, D., De Joung, D., Armstron, D., Mantilla, C., Zozaya, A., Jaycox, E., Alvarado, F., Handal, S. & Meneses, L. (1990). Enfermedades y plagas de la abeja Melífera Occidental. Programa Regional para el manejo y control de la abeja africana. División de salud animal. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agrícola. San Salvador. pp. 64-117.
- Molineri, A., Giacobino, A., Pacini, A., Bulacio Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciángelo, G., Zago, L., Aignasse, A., Pietronave, H., Rodríguez, G., Crisanti, P., Palacio, M.A. & Signorini, M. (2018). Environment and *Varroa destructor* management as determinant of colony losses in apiaries under temperate and subtropical climate, J. Apic. Res. DOI:10.1080/00218839.2018.1475697.
- Molineri, A.I., Pacini, A., Giacobino, A., Bulacio-Cagnolo, N., Aignasse, A., Zago, L., Fondevila, N., Ferrufno, C., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Pietronave, H. & Signorini, M.L. (2017). Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. Rev Argent Microbiol 49(2):166–173. DOI:10.1016/j.ram.2016.12.0040
- Mondet, F., Alaux, C., Severac, D., Rohmer, M., Mercer, A.R. & Le Conte, Y. (2015). Antennae hold a key to *Varroa* sensitive hygiene behaviour in honey bees. Scientific Reports 5, 10454.
- Mondet, F., Beaurepaire, A., McAfee, A., Locke, B., Alaux, C. *et al.* (2020). Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. International Journal for Parasitology, Elsevier, 50 (6-7), pp.433-447. DOI:10.1016/j.ijpara.2020.03.005.
- Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y. & Mercer, A.R. (2014). On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*. PLoS Pathog 10(8): e1004323. DOI:10.1371/journal.ppat.1004323
- Mondragón, L., Martin, S. & Vandame, R. (2006). Mortality of mite offspring: a major component of *Varroa destructor* resistance in a population of Africanized bees. Apidologie, 37(2), 67-74.
- Mondragón, L., Spivak, M. & Vandame, R. (2005). A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. Apidologie 36, 345–358.
- Morawetz, L., Köglberger, H., Griesbacher, A., Derakhshifar, I., Crailsheim, K., Brodschneider, R. & Moosbeckhofer, R. (2018). Health status of honey bee colonies (*Apis mellifera*) and disease-related risk factors for colony losses in Austria. PLoS ONE 14, e0219293.
- Moretto, G. & de Mello, L.J. (1999). *Varroa jacobsoni* infestation of adult Africanized and Italian honey bees (*Apis mellifera*) in mixed colonies in Brazil. Genetics and Molecular Biology. 22(3):321–323. DOI:10.1590/S1415-47571999000300006
- Moretto, G. (2002). Mortality of *Varroa destructor* in broodless africanized and carnica honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Interciencia 27 (12), 702–704.
- Moretto, G., Gonçalves, L.S. & De Jong, D. (1993). Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. Rev. Bras. Genet. 16, 71–77.
- Moretto, G., Gonçalves, L.S., De Jong, D. & Bichuette, M.Z. (1991) The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. infestations in Brazil. Apidologie 22 , 197–203.
- Morfin, N., Given, K., Evans, M., Guzman-Novoa, E. & Hunt, G.J. (2019). Grooming behavior and gene expression of the Indiana “mite-biter” honey bee stock. Apidologie.
- Morfin, N., Goodwin, P.H. & Guzman-Novoa, E. (2020). Interaction of field realistic doses of clothianidin and *Varroa destructor* parasitism on adult honey bee (*Apis mellifera* L.) health and neural gene expression, and antagonistic effects on differentially expressed genes. PLoS One 15:e0229030. DOI:10.1371/ journal.pone.0229030
- Moritz, R.F.A. & Southwick, E.E. (1992). Bees as superorganisms. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Moritz, R.F.A., Härtel, S. & Neumann, P. (2005). Global invasions of the western honey bee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. Ecoscience, 12, 289–301.DOI:10.2980/i1195-6860-12-3-289.1

- Moro, A., Blacquière, T., Dahle, B., Dietemann, V., Le Conte, Y., Locke, B., Neumann, P. & Beaulépaire, A. (2021a). Adaptive population structure shifts in invasive parasitic mites, *Varroa destructor*. *Ecol. Evol.* 11, 5937–5949. DOI:10.1002/ece3.7272.
- Moro, A., Blacquière, T., Panziera, D., Dietemann, V. & Neumann, P. (2021b). Host-parasite co-evolution in real-time: changes in honey bee resistance mechanisms and mite reproductive strategies. *Insects* 12. DOI:10.3390/insects12020120.
- Morrissey, B.J. *et al.* (2015). Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. *Environmental Microbiology* 17 (4): 1414–1424. DOI:10.1111/1462-2920.12625.
- Mortensen, A.N., Schmehl, D.R., Allsopp, M., Bustamante, T.A., Kimmel, C.B., Dykes, M.E. & Ellis, J.D. (2016). Differences in *Varroa destructor* infestation rates of two indigenous subspecies of *Apis mellifera* in the republic of South Africa. *Experimental and Applied Acarology*, 68: 509-515. DOI:10.1007/s10493-015-9999-8
- Motta, E.V.S. & Moran, N.A. (2020b). Impact of Glyphosate on the Honey Bee Gut Microbiota: Effects of Intensity, Duration, and Timing of Exposure. *MSystems*.
- Motta, E.V.S., Mak, M., Tyler, K., De Jong, J., Powell, E., O'Donnell, A., Suhr, K.J., Riddington, I.A. & Moran, N.A. (2020a). Oral or Topical Exposure to Glyphosate in Herbicide Formulation Impacts the Gut Microbiota and Survival Rates of Honey Bees. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e01150-20.
- Motta, E.V.S., Raymann, K. & Moran, N.A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA*. 09; 115(41):10305–10. DOI:10.1073/pnas.1803880115 PMID:30249635
- Mráz, P., Hýbl, M., Kopecký, M., Bohatá, A., Hoštičková, I., Šipoš, J., Vočadlova, K. & Curn, V. (2021). Screening of Honey Bee Pathogens in the Czech Republic and Their Prevalence in Various Habitats. *Insects* 12, 1051.
- Muli, E., Patch, H., Frazier, M., Frazier, J., Torto, B., Baumgarten, T., Kilonzo, J., Ng'ang'a Kimani, J., Mumoki, F., Masiga, D., Tumlinson, J. & Grozinger, C.M. (2014). Evaluation of the Distribution and Impacts of Parasites, Pathogens, and Pesticides on Honey Bee (*Apis mellifera*) Populations in East Africa. *PLoS ONE* 9, e94459.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R. & Pettis, J.S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS one* 5(3), e9754.
- Muntaabski, I., Russo, R.M., Liendo, M.C., Palacio, M.A., Cladera, J.L., Lanzavecchia, S.B. & Scannapieco, A.C. (2020). Genetic variation and heteroplasmy of *Varroa destructor* inferred from ND4 mtDNA sequences. *Parasitology Research*, 119: 411-421. DOI:10.1007/s00436-019-06591-5.
- Muñoz, I., Dall'Olio, R., Lodesani, M. & De la Rúa, P. (2009). Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*, 40, 617–626.
- Muñoz, I., Lodesani, M., de la Rúa, P., & Dall'Olio, R. (2014). Estimating introgression in *Apis mellifera siciliana* populations: are the conservation islands really effective? *Insect Conservation and Diversity*, 7(6), 563-571, DOI: <https://doi.org/10.1111/icad.12092>
- Murray, K.D., Aronstein, K.A. & Jones, W.A. (2005). A Molecular Diagnostic Method for Selected *Ascosphaera* Species Using PCR Amplification of Internal Transcribed Spacer Regions of rDNA. *J. Apic. Res.* 44, 61–64.
- Mussen, E.C. & Furgala, B. (1977). Replication of sacbrood virus in larval and adult honeybees, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 30:20–34. DOI:10.1016/0022-2011(77)90033-7
- Nakjang, S. *et al.* (2013). Reduction and expansion in microsporidian genome evolution: new insights from comparative genomics. *Genome Biol. Evol.* 5, 2285–2303
- Nandhini, A.R., Harshiny, M. & Gummadi, S.N. (2021). Chlorpyrifos in environment and foods: A critical review of detection methods and degradation pathways. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 1-61. DOI:10.1039/D1EM00178G.
- Nanetti, A., Bortolotti, L. & Cilia, G. (2021). Pathogens Spillover from Honey Bees to Other Arthropods. *Pathogens* 10, 1044.

- Natsopoulou, M., McMahon, D., Doublet, V., Frey, E., Rosenkranz, P. & Paxton, R. (2017). The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. *Sci Rep* 7:5242. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05596-3>
- Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P., Doublet, V., Bryden, J. & Paxton, R.J. (2015). Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc. Biol. Sci.* 282, 20141896.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L. & Kausmann, M. (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 76, 55–69. DOI:10.1016/S0048-3575(03)00065-8
- Navajas, M., Le Conte, Y., Solignac, M., Cros-Arteil, S. & Cornuet, J.M. (2002). The complete sequence of the mitochondrial genome of the honeybee ectoparasite mite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Mol. Biol. Evol.* 19, 2313–2317.
- Nazzi, F. & Pennacchio, F. (2014). Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. *Trends Parasitol.* 30, 556–561. DOI:10.1016/j.pt.2014.09.006
- Nazzi, F. & Pennacchio, F. (2018). Honey bee antiviral immune barriers as affected by multiple stress factors: a novel paradigm to interpret colony health decline and collapse. *Viruses* 10, 159
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E. & Pennacchio, F. (2012). Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. *PLOS Pathog.* 8, e1002735.
- Nedic, N., Francis, R.M., Stanisavljević, L., Pihler, I., Kezić, N., Bendixen, C. & Kryger, P. (2014). Detecting population admixture in honey bees of Serbia. *J. Apic. Res.* 53, 303–313.
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E. & Amdam, G.V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* 5, 673–677.
- Nelson, R.M., Wallberg, A., Simoes, Z.L.P., Lawson, D.J. & Webster, M.T. (2017). Genome wide analysis of admixture and adaptation in the Africanized honey bee. *Molecular Ecology*, 26(14), 3603–3617. DOI:10.1111/mec.14122
- Neumann, G., Kohls, S., Landsberg, K., Stock-Oliveira Souza, K., Yamada, T. & Romeheld, V. (2006). Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *J. Plant Dis. Prot.* 20, 963–970.
- Neumann, P. & Blacquière, T. (2016). The Darwin cure for apiculture? Natural selection and managed honeybee health. *Evol. Appl.* 10 (3), 226–230.
- Neumann, P. & Carreck, N.L. (2010). Honey bee colony losses. *J. Apicult. Res.* 49, 1–6. DOI:10.3896/IBRA.1.49.1.01.
- Nganso, B.T., Fombong, A.T., Yusuf, A.A., Pirk, C.W.W., Stuhl, C. & Torto, B. (2017). Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees—New damage categories in *Varroa destructor*. *PLoS ONE* 12, e0179329. DOI:10.1371/journal.pone.0179329.
- Nganso, B.T., Fombong, A.T., Yusuf, A.A., Pirk, C.W.W., Stuhl, C., Torto, B. (2018). Low fertility, fecundity and numbers of mated female offspring explain the lower reproductive success of the parasitic mite *Varroa destructor* in African honeybees. *Parasitology* 145, 1633–9.
- Nicoletti, R. & Becchimanzi, A. (2022). Ecological and Molecular Interactions between Insects and Fungi. *Microorganisms* 10, 96.
- Nielsen, S.L., Nicolaisen, M. & Kryger, P. (2008). Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie* 39, 310–314.
- Nolan, M.P. & Delaplane, K.S. (2017). Distance between honey bee *Apis mellifera* colonies regulates populations of *Varroa destructor* at a landscape scale. *Apidologie*, 48, 8–16.
- Norfolk, O., Gilbert F. & Eichhorn, M.P. (2018). Alien honey bees increase pollination risks for rangerestricted plants. *Diversity and Distributions*. 24: 705–713.

O'Grady Milbrath, M., Fowler, P.D., Abban, S.K., Lopez, D. & Evans, J.D. (2021). Validation of Diagnostic Methods for European Foulbrood on Commercial Honey Bee Colonies in the United States. *Journal of Insect Science*, 21(6): 6; 1–6. DOI:10.1093/jisesa/ieab075

O'neal, S.T., Anderson, T.D. & Wu-Smart, J.Y. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 26, 57– 62

Oddie, M.A., Dahle, B. & Neumann, P. (2017). Norwegian honey bees surviving *Varroa destructor* mite infestations by means of natural selection. *PeerJ* 5, e3956.

Odemer, R. (2020). Reproductive capacity of *Varroa destructor* in four different honey bee subspecies. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Volume 27, Issue 1. ISSN 1319-562X. DOI:10.1016/j.sjbs.2019.09.002.

Odemer, R., Nilles, L., Linder, N. & Rosenkranz, P. (2018). Sublethal effects of clothianidin and *Nosema* spp. on the longevity and foraging activity of free flying honey bees. *Ecotoxicology* 27, 527e538. DOI:10.1007/s10646-018-1925-5

OECD. (1998). OECD guideline for testing of chemicals. Test No 213: Honey bees, acute oral toxicity test.

OEPP/EPPO. (2003). EPPO Standards Environmental risk assessment scheme for plant protection products. *Bull OEPP/EPPO* 33: 141–145.

Ohno, I., Tomizawa, M., Miyazu, N., Kushibiki, G., Noda, K., Hasebe, Y., Durkin, K., Miyake, T. & Shinzo, K. (2010). Structural features of phenoxy carbonylimino neonicotinoids acting at the insect nicotinic receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 20, 5933–5935.

OIE - Office International des Epizooties —World Organisation for Animal Health. (2012). Manual of standards for diagnostic test and vaccines. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

OIE - Office International des Epizooties —World Organisation for Animal Health. (2021). Varroosis of Honey Bees (Infestation of Honey Bees with *Varroa* spp.). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (Online Version); OIE: Paris, France; pp. 1–13. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.02.07_Varroosis.pdf

OIE - Office International des Epizooties —World Organisation for Animal Health. (2023a). Chapter 3.2.2: American foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*) In: *WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, France, pp. 719–735. ISBN 978-92-95108-18-9. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf

OIE - Office International des Epizooties —World Organisation for Animal Health. (2023b). Chapter 3.2.3: European foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*) In: *WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.03_EUROPEAN_FOULBROOD.pdf

OIE - Office International des Epizooties —World Organisation for Animal Health. (2024). Chapter 2.2.4: Nosemosis of Honey Bees In: *WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Available online: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMOSIS.pdf

OIE - World Organisation for Animal Health. (2009). World Animal Health Information Database. Paris, France. <https://www.oie.int>.

Okumura, K., Takamatsu, D. & Okura, M. (2018). Complete Genome Sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a Strain That Shows an Unusual Growth Profile, Obtained by PacBio Sequencing. *Genome Announc.* 6: 4–5.

Okumura, K., Takamatsu, D. & Okura, M. (2019). Complete Genome Sequences of two *Melissococcus plutonius* Strains with Different Virulence Profiles, Obtained by PacBio Sequencing. *Microbiol. Resour. Announc.* 8: 9–10.

Okumura, K., Arai, R., Okura, M., Kirikae, T., Takamatsu, D., Osaki, M. & Miyoshi-Akiyama, T. (2011). Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. *J. Bacteriol.* 193: 4029–4030.

Oldroyd, B.P. & Fewell, J.H. (2007). Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. *Trends Ecol.Evol.* 22, 408–413.

- Oldroyd, B.P. & Palmer, K.A. (2003). Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): Further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. *Naturwissenschaften* 90, 265–268.
- Olynyk, M., Westwood, A.R. & Koper, N. (2021). Effects of natural habitat loss and edge effects on wild bees and pollination services in remnant prairies. *Environ. Entomol.* 50 (3), 732–743. DOI:10.1093/ee/nvaa186.
- Orr, M.C., Hughes, A.C., Chesters, D., Pickering, J., Zhu, C.-D. & Ascher, J.S. (2020). Global patterns and drivers of bee distribution. *Curr. Biol.* 31, 1–8.
- Osman, A., Sbhatu, D. B., & Giday, M. (2020). Medicinal plants used to manage human and livestock ailments in Raya Kobo District of Amhara Regional State, Ethiopia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- Osterman, J., Wintermantel, D., Ründlof, M. & de Miranda, J. (2022). How does an insecticide seed-treatment affect honeybee and bumblebee colonies and their pathogens, parasites, and beneficial bacteria?. Conference: PoshBee stakeholder summary.
- Otis, G.W., Taylor, O.R. & Winston, M.L. (2002). Colony size affects reproductive attributes of African honey bees (*Apis mellifera* L.). *Proceedings of the 2nd International Conference on Africanized Honey Bees and Bee Mites*. Root, Medina, Ohio: 25–32
- Otten, C. & Otto, A. (2005). Epidemiology and control of the American foul- brood in Germany. *Journal of Apicultural Research* 40: 16–22.
- Oxley, P.R. & Oldroyd, B.P. (2010). The genetic architecture of honeybee breeding. In *Advances in Insect Physiology* Vol. 39 (ed. Simpson, S. J.-Elsevier, Amsterdam).
- 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. (2016b). Risk factors associated with the abundance of *Nosema spp.* in apiaries located in temperate and subtropical conditions after honey harvest. *J. Apic. Res.* 5 5 (4): 342–350. DOI:10.1080/00218839.2016.1245396.
- Pacini, A., Molineri, A., Antúnez, K., Bulacio Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Zago, L., Aignasse, A., Pietronave, H., Rodriguez, G., Palacio, M.A., Signorini, M. & Giacobino, A. (2021). Environmental conditions and beekeeping practices associated with *Nosema ceranae* presence in Argentina. *Apidologie* 52:400–417. DOI:10.1007/s13592-020-00831-9
- Palacio, M.A., Figini, E.E., Ruffinengo, S.R., Rodriguez, E.M., del Hoyo, M.L. & Bedascarrasbure, E.L. (2000). Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* 31, 471–478.
- Palmer, M.J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G.A. & Connolly, C.N. (2013). Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat Commun.* 4: 1634. DOI:10.1038/ncomms2648 PMID:23535655
- Pamminger, T., Botías, C., Goulson, D. & Hughes, W.O.H. (2018). A mechanistic framework to explain the immunosuppressive effects of neurotoxic pesticides on bees. *Funct. Ecol.* 32 (8), 1921–1930. DOI:10.1111/1365-2435.13119.
- Panek, J., Paris, L., Roriz, D., Mone, A., Dubuffet, A., Delbac, F., *et al.* (2018). Impact of the Microsporidian *Nosema ceranae* on the Gut Epithelium Renewal of the Honeybee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 159, 121–128. DOI: 10.1016/j.jip.2018.09.007
- Pang, S., Lin, Z., Zhang, W., Mishra, S., Bhatt, P. & Chen, S. (2020). Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of neonicotinoids. *Front. Microbiol.* 11:868. DOI:10.3389/fmicb.2020.00868
- Papini, R., Mancianti, F., Canovai, R., Cosci, F., Rocchigiani, G., Benelli, G. & Canale, A. (2017). Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in Central Italy Saudi. *J. Biol. Sci.*, 24, 979–982, DOI:10.1016/j.sjbs.2017.01.010.

- Pareja, L., Jesús, F., Heinzen, H., Hernando, M.D., Rajski, Ł. & Fernandez-Alba, A.R. (2019). Evaluation of glyphosate and AMPA in honey by water extraction followed by ion chromatography mass spectrometry. A pilot monitoring study. *Anal. Methods* 11, 2123–2128.
- Park, M.G., Blitzer, E.J., Gibbs, J., Losey, J.E. & Danforth, B.N. (2015). Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 282, 20150299.
- Pasho, D.J.M., Applegate, J.R. & Hopkins, D.I. (2021). Diseases and Pests of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Vet. Clin. N. Am. Food Anim.* 37, 401–412.
- Patenković, A., Tanasković, M., Erić, P., Erić, K., Mihajlović, M., Stanisavljević, L. & Davidović, S. (2022). Urban ecosystem drives genetic diversity in feral honey bee. *Scientific Reports* 12:17692. DOI: 10.1038/s41598-022-21413-y
- Peck, D. (2021). The parasitic mite *Varroa destructor*: history, biology, monitoring, and management. In: *Honey bee medicine for the veterinary practitioner*. DOI:10.1002/9781119583417.ch20
- Peck, D.T., Smith, M.L. & Seeley, T.D. (2016). *Varroa destructor* mites can nimbly climb from flowers onto foraging honey bees. *PLoS One* 11 (12), e0167798. DOI:10.1371/journal.pone.0167798
- Pedersen, B.V. (1996). On the phylogenetic position of the Danish strain of the black honeybee (the Laeso bee), *Apis mellifera mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Entomologica Scandinavica* 27:241-250. DOI: 10.1163/187631296X00070
- Péntek-Zakar, E., Oleksa, A., Borowik, T. & Kusza, S. (2015). Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecol. Evol.* 5, 5456–5467
- Pérez, M.A., Segura, A., García, R., Colinas, T., Pérez, M., Vázquez, A. & Navarro, H. (2009). Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brócoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, núm. 2, vol. 25.
- Pérez-Castro, E.E., May-Itzá, W. de J. & Quezada-Euán, G.J.J. (2002). Thirty years after: a survey on the distribution and expansion of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in Peru, *Journal of Apicultural Research*, 41:3-4, 69-73, DOI:10.1080/00218839.2002.11101071
- Peterson, E.M, Green, F.B., Subbiah, S., Emert, A. & Smith, P.N. (2022). Agrochemical occurrence on colocated wildflowers and wild bees collected near beef cattle feed yards and row crops. *Integr Environ Assess Manag* 18(1):163-173. PMID: 33913622 DOI:10.1002/ieam.4436
- Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R., vanEngelsdorp, D., *et al.* (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One* 8:e70182. DOI:10.1371/journal.pone.0070182
- Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., Johnson, J. & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99: 153–8.
- Phillips, E.F. (1918). *Beekeeping* (Applewood Books, Carlisle).
- Phokasem, P., Mookhploy, W., Krongdang, S., Sinpoo, C. & Chantawannakul, P. (2022). Interaction between Thiamethoxam and Deformed Wing Virus Type A on Wing Characteristics and Expression of Immune and Apoptosis Genes in *Apis mellifera*. *Insects* 13, 515. DOI:10.3390/insects13060515
- Pietropaoli, M. & Formato, G. (2020). Good Beekeeping Practices: FAO Practical Manual on How to Identify and Control the Main Diseases of the Honeybee (*Apis mellifera*); FAO: Rome, Italy. <https://www.fao.org/policy-support/tools-and-publications/resources-details/en/c/1393274/> (acceso Noviembre 2023).
- Pietropaoli, M., Ribarits, A., Moosbeckhofer, R., Köglberger, H., Alber, O., Gregorc, A., Smoldis Skerl, M.I., Presern, J., Bubnic, J., Necati Muz, M., *et al.* (2021). Biosecurity measures in European beekeeping. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 39. www.oie.int/app/uploads/2021/06/21062021-00179-en-pietropaoli-formato-ang.pdf (acceso Noviembre 2023).

Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N. & Tournier, I. (2013). A four year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PLoS One* 8:e77193. DOI:10.1371/journal.pone.0077193

Pimentel, D. (2002). Silent spring revisited: have things changed since 1962?. *Pesticide Outlook*, núm. 13.

Pinnock, D.E. & Featherstone, N.E. (1984). Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Apicultural Research*, 23, 168–170. DOI:10.1080/00218839.1984.11100627

Pinto, F.A., Puker, A., Message, D. *et al.* (2015). Infestation rate of the mite *Varroa destructor* in commercial apiaries of the Vale do Paraíba and Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil. *Arq Bras Med Veterinária E Zootec* 67:631–635. DOI:10.1590/1678-7264

Pinto, M.A., Henriques, D., Chavez-Galarza, J., Kryger, P., Garnery, L., van der Zee, R., *et al.* (2014). Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 269–278. DOI:10.3896/IBRA.1.53.2.08

Pinto, M.A., Johnston, S.J., Rubink, W.L., Coulson, R.N., Patton, J.C. & Sheppard, W.S. (2003). Identification of Africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae) mitochondrial DNA: Validation of a rapid polymerase chain reactionbased assay. *Annals of the Entomological Society of America*, 96(5), 679–684. DOI:10.1603/0013-8746(2003)096[0679:IOAHBH]2.0.CO;2

Pinto, M.A., Rubink, W.L., Patton, J.C., Coulson, R.N. & Johnston, J.S. (2005). Africanization in the United States: Replacement of feral European honey bees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. *Genetics*, 170 (4), 1653–1665. DOI:10.1534/genetics.104.035030

Pinto, M.A., Rubnik, W.L., Coulson, R.N., Patton, J.C. & Johnston, J.S. (2004). Temporal pattern of Africanization in a feral honeybee population from Texas inferred from mitochondrial DNA. *Evolution*, Volume 58, Issue 5, 1 May 2004, Pages 1047–1055. DOI:10.1111/j.0014-3820.2004.tb00438.x

Pinto, M.A., Sheppard, W.S., Johnston, J.S., Rubink, W.L., Coulson, R.N., Schiff, N.M., Kandemir, I. & Patton, J.C. (2007). Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) of African Origin Exist in Non-Africanized Areas of the Southern United States: Evidence from Mitochondrial DNA, *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 100, Issue 2, 1 March Pages 289–295. DOI:10.1603/0013-8746(2007)100[289:HBHAAO]2.0.CO;2

Piot, N., Schweiger, O., Meeus, I. *et al.* (2022). Honey bees and climate explain viral prevalence in wild bee communities on a continental scale. *Scientific Reports* 12, 1904

Piot, N., Smagghe, G. & Meeus, I. (2020). Network centrality as an indicator for pollinator parasite transmission via flowers. *Insects* 11, 872

Pirk, C.W.W., Crewe, R.M. & Moritz, R.F.A. (2017). Risks and benefits of the biological interface between managed and wild bee pollinators. *Functional Ecology*. 31: 47–55.

Pirk, C.W.W., Strauss, U., Yusuf, A.A., Démares, F. & Human, H. (2016). Honeybee health in Africa—a review. *Apidologie* 47, 276–300. DOI:10.1007/s13592-015-0406-6

Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., & Wiemers, M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(1), 68–102. DOI:10.1007/s11356-014-3471-x

Pislak Ocepek, M., Toplak, I., Zajc, U. & Bevk, D. (2021). The Pathogens Spillover and Incidence Correlation in Bumblebees and Honeybees in Slovenia. *Pathogens* 10, 884. DOI:10.3390/pathogens10070884

Plettner, E., Eliash, N., Singh, N., Pinnelli, G. & Soroker, V. (2017). The chemical ecology of host parasite interaction as a target of *Varroa destructor* control agents. *Apidologie*, 48(2), 78-92.

Plischuk, S. & Lange, C.E. (2016). *Bombus brasiliensis* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) infected with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Revista Brasileira De Entomologia*; vol. 60 p. 347 – 351

- Plischuk, S., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A.H., Lange, C. & Higes, M. (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* 1 (2), 131–135.
- Plischuk, S., Salvarrey, S., Arbulo, N., Santos, E., Skevington, J.H., Kelso, S., Revainera, P., Maggi, M.D., Invernizzi, C. & Lange, C.E. (2017). Pathogens, parasites, and parasitoids associated with bumble bees (*Bombus* spp.) from Uruguay. *Apidologie*; vol. 48 p. 298 – 310
- Ponce de León-Door, A., Romo-Chacón, A., Rios-Velasco, C., Baruk Zamudio-Flores, P., de Jesús Ornelas-Paz, J. & Acosta-Muñiz, C.H. (2018). Prevalence, typing and phylogenetic analysis of *Melissococcus plutonius* strains from bee colonies of the State of Chihuahua, Mexico, *Journal of Invertebrate Pathology* 159: 71–77. DOI:10.1016/j.jip.2018.10.006
- Porrini, C., Mutinelli, F., Bortolotti, L., Granato, A., Laurenson, L., Roberts, K., Gallina, A., Silvester, N., Medrzycki, P., Renzi, T., *et al.* (2016). The Status of Honey Bee Health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network. *PLoS ONE* 11, e0155411. DOI:10.1371/journal.pone.0155411
- Porrini, L.P., Quintana, S., Brasesco, C., Porrini, M.P., Garrido, P.M., Eguaras, M.J., Müller, F. & Fernández Iriarte, P. (2019). Southern limit of Africanized honey bees in Argentina inferred by mtDNA and wing geometric morphometric analysis. *Journal of Apicultural Research*. DOI:10.1080/00218839.2019.1681116
- Porrini, M.P., Porrini, L.P., Garrido, P., De Melo e Silva Neto, C., Porrini, D., Muller, F., Nuñez, L.A., Alvarez, L.J., Fernández Iriarte, P., Eguaras, M.J. (2017). *Nosema ceranae* on Argentinian and Brazilian native stingless bees and social wasp. *Microb Ecol.* DOI:10.1007/s00248-017-0975-1
- Porto, R.G., De Almeida, R.F., Cruz-Neto, O. *et al.* (2020). Pollination ecosystem services: A comprehensive review of economic values, research funding and policy actions. *Food Security* 12, 1425–42.
- Posada-Florez, F., Childers, A.K., Heerman, M.C., Egekwu, N.I., Cook, S.C., Chen, Y., Evans, J.D., & Ryabov, E. (2019). Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner. *Scientific Reports*, 9, 12445. DOI: 10.1038/s41598-019-47447-3
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. & Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 345-53. DOI:10.1016/j.tree.2010.01.007
- Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H.T. *et al.* (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* 540, 220–9.
- Poulin, R. (2007). *Evolutionary Ecology of Parasites*, 2nd Edn. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Preston, D.L., Mischler, J.A., Townsend, A.R. & Johnson, P.T.J. (2016). Disease ecology meets ecosystem science. *Ecosystems* 19, 737–48.
- Prisco, G.D., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., *et al.* (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 18466–18471. DOI:10.1073/pnas.1314923110
- Pusceddu, M., Cini, A., Alberti, S. *et al.* (2021). Honey bees increase social distancing when facing the ectoparasite *Varroa destructor*. *Science Advances* 7.
- QGIS Development Team. (2023). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospat. Found. Proj. Available online: <http://qgis.osgeo.org> (accessed on November 2023).
- Quezada-Euan, J.J.G., Perez-Castro, E.E., & May-Itza, W.D.J. (2003). Hybridization between European and African-derived honey bee populations (*Apis mellifera*) at different altitudes in Peru. *Apidologie*, 34(3), 217–225. DOI:10.1051/apido:2003010
- Quintana, S., Brasesco, C., Porrini, L.P., Di Gerónimo, V., Eguaras, M.J. & Maggi, M. (2019). First molecular detection of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees (*Apis mellifera*) in Argentina. *J Apic Res* 59(2):211–217. DOI:10.1080/00218 839.2019.1690100

- Raberg, L., Graham, A.L., & Read, A.F. (2009). Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364(1513), 37–49. DOI:10.1098/rstb.2008.0184
- Raimets, R., Bont sut snaja, A., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Kaart, T., Puusepp, L., Pihlik, P., Keres, I., Viinalass, H., Mand, M. & Karise, R. (2020). Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. *Chemosphere* 238, 124555.
- Raina, S.D. & Fries, I. (2004). American foulbrood and African honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 96:1641–6.
- Rainey, W.T., Christie, W.H. & Lijinsky, W. (1978). Mass spectrometry of N-nitrosamines. *Biomed. Mass Spectrom.* 5, 395–408.
- Ramos-Cuellar, A.K., De la Mora, A., Contreras-Escareño, F., Morfin, N., Tapia-González, J.M., Macías-Macías, J.O., Petukhova, T., Correa-Benítez, A. & Guzman-Novoa, E. (2022). Genotype, but Not Climate, Affects the Resistance of Honey Bees (*Apis mellifera*) to Viral Infections and to the Mite *Varroa destructor*. *Vet. Sci.*, 9, 358. DOI:10.3390/vetsci9070358
- Ramsey, S.D., Ronal, O., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M., Ellis, J.D., Hawthorne, D., vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc Natl Acad Sci* 116(5):1792–1801. DOI:10.1073/pnas.1818371116
- Randi, E. (2008). Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology*, 17(1), 285–293. DOI:10.1111/j.1365-294X.2007.03417.x
- Rangel, J., Giresi, M., Pinto, M.A., Baum, K.A., Rubink, W.L., Coulson, R.N., & Johnston, J.S. (2016). Africanization of a feral honey bee (*Apis mellifera*) population in south Texas: Does a decade make a difference? *Ecology and Evolution*, 6(7), 2158–2169. DOI:10.1002/ece3.1974
- Rangel, J., Traver, B., Stoner, M., Hatter, A., Trevelline, B., Garza, C. *et al.* (2020). Genetic diversity of wild and managed honey bees (*Apis mellifera*) in Southwestern Pennsylvania, and prevalence of the microsporidian gut pathogens *Nosema ceranae* and *N. apis*. *Apidologie* 51, 802–814. DOI:10.1007/s13592-020-00762-5
- Rasmussen, C. *et al.* (2021). Evaluating competition for forage plants between honey bees and wild bees in Denmark. *PLoS ONE* 16, e0250056
- Ratnieks, F.L. & Carreck, N.L. (2010). Clarity on honey bee collapse?. *Science*, 327(5962), 152-153.
- Raymann, K. & Moran, N.A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 26, 97–104.
- Reinke, A.W. *et al.* (2017). Identification of Microsporidia hostexposed proteins reveals a repertoire of rapidly evolving proteins. *Nat. Commun.* 9, 14023
- Remnant, E.J., Mather, N., Gillard, T.L., Yagound, B. & Beekman, M. (2019). Direct transmission by injection affects competition among RNA viruses in honeybees. *Proc. Biol. Sci.* 286, 20182452
- Remnant, E.J., Shi, M., Buchmann, G., Blacquiére, T., Holmes, E.C., Beekman, M., & Ashed, A. (2017). A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *Journal of Virology*, 91 (16), e00158-17. DOI:10.1128/JVI.00158-17
- RENAPA Registro Nacional de Productores Apícolas. (2023). Datos Ganadería, Agricultura y Pesca/ Dataset/ Recurso: Apiarios y colmenas—Por provincia. <https://datos.magyp.gob.ar/dataset/15fbd380-fa31-436c-9283-457c23e30ecc/archivo/fcf61106-a82c-4ce7-9997-a7f0f40345b5>. Accessed May 2023.
- Requier, F. & Antúnez, K. (2020). Pérdidas de colmenas en Latinoamérica. Resultados: 2016/2017 SOLATINA (Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas). <https://solatina.org/perdidas-2016-2017/>
- Requier, F. (2020). Chapter: Honey Bees in Latin America in: Ilyasov R.A and Kwon H.W. *Phylogenetics of Bees*. Boca Raton, London, New-York: CRC Press Taylor & Francis Group. 290 pp. ISBN 9781138504233.

- Requier, F. *et al.* (2019). The conservation of native honey bees is crucial. *Trends Ecol. Evol.* 34, 789–798.
- Requier, F., Andersson, G., Oddi, F., Garcia, N. & Garibaldi, L. (2018). Perspectives from the Survey of Honey Bee Colony Losses During 2015–2016 in Argentina. *Bee World*, 95 (1): 9–12. DOI:10.1080/0005772 X.2018.1413620
- Requier, F., Leyton, M.S., Morales, C.L. *et al.* (2024). First large-scale study reveals important losses of managed honey bee and stingless bee colonies in Latin America. *Sci Rep* 14, 10079. DOI:10.1038/s41598-024-59513-6
- Retschnig, G., Kellermann, L.A., Mehmman, M.M., Yañez, O., Winiger, P., Williams, G.R. & Neumann, P. (2019). Black queen cell virus and drifting of honey bee workers (*Apis mellifera*). *J Apic Res* 58(5):754–755. DOI:10.1080/00218839.2019.1655133
- Retschnig, G., Williams, G., Schneeberger, A., Neumann, P. (2017). Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema* spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects*. DOI:10.3390/insects8010020.
- Retschnig, G., Williams, G.R., Mehmman, M.M., Yañez, O., de Miranda, J.R., *et al.* (2014). Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* 9: e85261.
- Reyes-Quintana, M., Espinoza-Montano, L.G., Prieto, D., Koleoglu, G., Petukhova, T., Correa-Benitez, A. & Guzman-Novoa, E. (2019). Impact of *Varroa destructor* and deformed wing virus on emergence, cellular immunity, wing integrity and survivorship of Africanized honey bees in Mexico. *J. Invertebr. Pathol.* 164, 43–48.
- Reynaldi, F.J., López, A.C., Albo, G.N. & Alippi, A.M. (2003). Differentiation of *Ascosphaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. *J Apicultural Res*; 42: 68-76.
- Reynaldi, F.J., Lucia, M., Genchi Garcia, M.L. (2015). *Ascosphaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees (*Xylocopa augusti*): first report in South America. *Rev. Iberoam. De. Micol.* 32 (4), 261–264. DOI:10.1016/j.riam.2015.01.001.
- Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Albicoro, F.J., Pecoraro, M.R. & Galosi, C.M. (2013). First molecular detection of co-infection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus* in South America. *Braz. J. Biol.* 73 (4), 797–800
- Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Pecoraro, M.R., Tizzano, M.A. & Galosi, C.M. (2010). First report of viral infections that affect Argentine honeybees. *Environ Microbiol Rep* 2(6):749–751. DOI:10.1111/j.1758-2229.2010.00173.x 113.
- Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Tizzano, M.A., Fuentealba, N., Galosi, C.M. & Pecoraro, M.R. (2011) First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología.* 43(2):84–86. DOI:10.1590/S0325 -75412011000200003
- Ribière, M., Ball, B.V. & Aubert, M.F.A. (2008). Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In: Aubert MFA, Ball BV, Fries I, Milani N, Morritz RFA (Eds) *Virology and the honey bee. Vith Framework.* EC Publications, Brussels, pp. 15–84
- Rigaud, T., Perrot-Minnot, M.-J. & Brown, M.J.F. (2010). Parasite and host assemblages: Embracing the reality will improve our knowledge of parasite transmission and virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277, 3693–702.
- Rinderer, T.E. & Hellmich, R. L. (1991). “The Process of Africanization,” in *The “African” Honey Bee*, eds M. Spivak, D. J. C. Fletcher, and M. D. Breed (Boulder CO: Westview Press), 95–117. DOI: 10.1525/ahu.2004.29.1.95
- Rinderer, T.E. & Rothenbuhler, W.C. (1976). Characteristic field symptoms comprising honeybee hairless-black syndrome induced in the laboratory by a virus. *J Invertebr Pathol* 27:215–219. DOI:10.1016/0022-2011(76)90148-8
- Rinderer, T.E. & Sylvester, H.A. (1978). Variation in response to *Nosema apis*, longevity, and hoarding behavior in a free-mating population of the honey bee. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 71, 372–374.
- Rinderer, T.E., Bucu, S.M., Rubink, W.L., Daly, H.V., Stelzer, J.A., Riggio, R.M. & Baptista, F.C. (1993). Morphometric identification of Africanized and European honeybees using large reference populations. *Apidologie* 24:569D585

- Rinderer, T.E., de Guzman, L.I., Delatte, G.T., Stelzer, J.A., Lancaster, V.A., Kuznetsov, V., Beaman, L., Watts, R. & Harris, J.W. (2001). Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from far-eastern Russia. *Apidologie* 32, 381–394.
- Rinderer, T.E., Harris, J.W., Hunt, G.J. & de Guzman, L.I. (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie* 41, 409–424
- Rinderer, T.E., Hellmich, R.L., Danka, R.G. & Collins, A.M. (1985). Male reproductive parasitism: a factor in the africanization of European honey-bee populations. *Science* 228:1119–1121. DOI:10.1126/science.228.4703.1119
- Rinderer, T.E., Sylvester, H.A., Bucu, S.M., Lancaster, V.A., Herbert, E.W., Collins, A.M. *et al.* (1987). Improved simple techniques for Identifying Africanized and European honey bees. *Apidologie*. 18: 179–196. DOI: 10.1051/apido:19870208.
- Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Ribarits, A., Moosbeckhofer, R., Alber, O., Kozmus, P., Jannoni-Sebastianini, R., Haefeker, W., Köglberger, H., Smodis Skerl, M.I., *et al.* (2019). Good farming practices in apiculture. *Rev. Sci. Tech.*, 38, 879–890
- Riveros, G., Arismendi, N., Zapata, N., Smagghe, G., Rodríguez, M., Gerding, M. & Vargas, M. (2018). A scientific note on first detection of Kashmir bee virus in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in South America. *Apidologie* 49(2):220–223. DOI:10.1007/s13592-017-0545-z
- Roberts, J.M.K., Anderson, D.L. & Durr, P.A. (2017). Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. *Sci. Rep.* 7:6925
- Robinson, G.E. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology* 37: 637–665.
- Robinson, G.E., Underwood, B.A. & Henderson, C.E. (1984). A highly specialized water-collecting honey bee. *Apidologie*, 15(3):355–358.
- Rodríguez, M., Vargas, M., Antúnez, K., Gerding, M., Castro, F. & Zapata, N. (2014). Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Bio-Bio Region, Chile, and their association with other honey bee pathogens. *Chilean J. Agric. Res.* 74, 170–177
- Rodríguez, M., Vargas, M., Gerding, M., Navarro, H. & Antúnez, K. (2012). Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *J. Apic. Res.* 51, 285–287
- Roetschi, A., Berthoud, H., Kuhn, R. & Imdorf, A. (2008). Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*. 39: 362–371. DOI:10.1051/apido:200819.
- Rondeau, G., Sánchez-Bayo, F., Tennekes, H.A., Decourtye, A., Ramírez-Romero, R. & Desneux, N. (2014). Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Sci Rep.* 4: 5566. DOI:10.1038/srep05566 PMID:24993452
- Rortais, A., Arnold, G., & Dorne, J.-L. (2017). Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European food safety authority. *Science of the Total Environment*, 587–588, 524–537.
- Rortais, A., Arnold, G., Alburaki, M., Legout, H. & Garnery, L. (2011). Review of the Dral COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genet Resour* (2011) 3:383–391. DOI:10.1007/s12686-010-9351-x
- Rortais, A., Villemant, C., Gargominy, O., Rome, Q., Haxaire, J., Papachristoforou, A. *et al.* (2010). A new enemy of Honey bees in Europe: the Asian hornet *Vespa velutina*. pp. 11. In: Settele, J. (ed.). *Atlas of Biodiversity Risks-from Europe to the Globe, from Stories to Maps*. Pensoft, Sofia.
- Rosenkranz, P. (1999). Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. In South America. *Apidologie* 30, 159–172. DOI:10.1051/apido:19990206
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(S1): S96–S119. DOI:10.1016/j.jip.2009.07.016.

- Rossi, C. & Carranza, M.R. (1980). Momificación de larvas (*Apis mellifera* L.) provocada por *Ascosphaera apis*. Revista Facultad de Agronomía; 56: 11-5.
- Rothenbuhler, W.C. (1964). Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Animal Behaviour*, 12(1), 578-583.
- Ruano, M.V., Fernández, F.M., Ochoa, A.C. & Valenzuela. (1991). Varroasis disturbs the orientation of bees its influence on parasitosis development. *Vida Apícola* 48:55-57
- Rubio, F., Guo, E. & Kamp, L. (2014). Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 4, 249.
- Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G. & Ganem, D. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* 6(6):e20656. DOI:10.1371/journal.pone.0020656
- Russo, I., Buckley, Y.M., Hamilton, H., Kavanagh, M. & Stout, J.C. (2020a). Low concentrations of fertilizer and herbicide alter plant growth and interactions with flower-visiting insects. *Agric. Ecosyst. Environ.* 304, 107141.
- Russo, L., Nichol, C. & Shea, K. (2016). Pollinator floral provisioning by a plant invader: quantifying beneficial effects of detrimental species. *Divers. Distrib.* 22, 189-198.
- Russo, R.M., Liendo, M.C., Landi, L., Pietronave, H., Merke, J., Fain, H., Muntaabski, I., Palacio, M.A., Rodríguez, G.A., Lanzavecchia, S.B., & Scannapieco, A.C. (2020b). Grooming behavior in naturally Varroa-resistant *Apis mellifera* colonies from north-central Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 590281. DOI:10.3389/fevo.2020.590281
- Ruttner, F. (1988). Biogeography and taxonomy of honey bees. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Ruttner, F., Tassencourt, L. & Louveaux, J. (1978). Biometrical-statistical analysis of the geographical variability of *Apis mellifera*. *Apidologie* 9, 363-381
- Ryabov, E.V., Posada-Florez, F., Rogers, C. *et al.* (2022). The vectoring competence of the mite *Varroa destructor* for deformed wing virus of honey bees is dynamic and affects survival of the mite. *Frontiers in Insect Science* 2, 931352.
- Saborío Cervantes, I.E., Mora Valverde, M. & Durán Monge, M.P. (2019). Intoxicación por organofosforados. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 110-117. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100110&lng=en&tlng=es.
- Salamanca Grosso, G. (2009). Variabilidad genética del ADN mitocondrial de poblaciones de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en Colombia. *Zootecnia Tropical*, 27(4), 373-382.
- Salina, M.D., Genchi García, M.L., Bais, B., Bravi, M.E., Brasesco, C., Maggi, M., Pecoraro, M., Larsen, A., Sguazza, G.H., & Reynaldi, F.J. (2021). Viruses that affect Argentinian honey bees (*Apis mellifera*). *Archives of Virology*, 166, 1533-1545. DOI: 10.1007/s00705-021-05000-6
- Salina, M.D., Vega, M., Bravi, M.E., Bais, B. & Sguazza, G.H. (2023). Fluctuación de la prevalencia viral en relación a la infestación por *Varroa destructor*. *EUNK - Revista Científica de Abejas y Apicultores*, Volumen 1, Número 2. DOI:10.52559/eunk.v1i2.25
- Sammataro, D., Gerson, U. & Needham, G. (2000), Parasitic mites of honey bees: Life history, implications, and impact. *Annual Review of Entomology* 45: 519- 548
- Sanchez, C., Castignani, H. & Rabaglio, M. (2018). El Mercado Apícola Internacional. Gestión de la innovación como Aporte para el Desarrollo Territorial, Ministerio de Agroindustria. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. PNAPI 1112052:1-23.
- Sánchez, S. (2012). Caracterización inmunotoxicológica en un modelo murino de neurotoxicidad encefálica inducida por Clorpirifós. Universidad del Tolima, Ibagué. (Tesis de pregrado)
- Sanchez-Bayo, F. & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—A risk assessment. *PLoS ONE* 9(4): e94482. DOI:10.1371/journal.pone.0094482 PMID:24718419

- Sánchez-Bayo, F. (2014). The trouble with neonicotinoids. Chronic exposure to widely used insecticides kills bees and many other invertebrates. *Science* 346, 806e807.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K. & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? —A brief review. *Environ Int.* 89–90:7–11.
- Sandrock, C., Tanadini, M., Tanadini, L.G., Fauser-Misslin, A., Potts, S.G. & Neumann, P. (2014). Impact of chronic neonicotinoid exposure on honey bee colony performance and queen supersedure. *PloS One* 9, e103592. DOI:10.1371/journal.pone.0103592.
- Santillán-Galicia, M.T., Ball, B.V., Clark, S.J. & Alderson, P.G. (2010). Transmission of Deformed Wing Virus and Slow Paralysis Virus to Adult Bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* 49, 141–148.
- Santos, L., Alves, M., Message, D., Pinto, F., Silva, M. & Teixeira, E. (2014). Honey Bee Health in Apiaries in the Vale do Paraíba, São Paulo State, Southeastern Brazil. *Sociobiology* 61 (3), 307–312
- Santoyo, S. (2014). Determinación de residuos de plaguicidas anticolinesterásicos en suelo y en el cultivo de cebollín, en el municipio de Villamar, Michoacán. Instituto Politécnico Nacional, Michoacán. (Tesis de Maestría)
- Sarlo, E. (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, Mar del Plata, Argentina.
- Schäfer, M.O. *et al.* (2010). Small hive beetles, *Aethina tumida*, are vectors of *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 41 (1): 14–20. DOI:10.1051/apido/2009037.
- Schirach, G.A. (1769). *Histoire des Abeilles*, p. 56 (Chapter 3).
- Schmid-Hempel, P. (1998). *Parasites in Social Insects*; Princeton University Press: Princeton, NJ, USA, pp. 119–123, ISBN 9780691059242.
- Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 529-551.
- Schmid-Hempel, P. (2009). Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for ‘macroscopic phenomena’ such as virulence. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 85-98.
- Schmid-Hempel, P. (2011). *Evolutionary parasitology: The integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics*. Oxford Biol. Oxford University Press, England; p. 223. DOI:10.1093/acprof:oso/9780199229482.001.000
- Schmid-Hempel, R. & Tognazzo, M. (2010). Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57, 337–345. DOI:10.1111/j.1550-7408.2010.00480.x.
- Schmuck, R. & Lewis, G. (2016). Review of field and monitoring studies investigating the role of nitro-substituted neonicotinoid insecticides in the reported losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology* 25, 1617e1629. DOI:10.1007/s10646-016-1734-7
- Schneider, C.W., Tautz, J., Grünewald, B. & Fuchs, S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PloS One* 7, e30023. DOI:10.1371/journal.pone.0030023
- Schneider, S.S. & McNally, L.C. (1992). Seasonal patterns of foraging activity in colonies of the African honey bee, *Apis mellifera scutellata*, in Africa. *Ins. Soc.* 39:181-193. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Schneider, S.S., Degrandi-Hoffman, G. & Smith, D.R. (2004). The African honey bee: Factors contributing to a successful biological invasion, *Annual Review of Entomology*, 49, 351–376. DOI:10.1146/annurev.ento.49.061802.123359
- Schöning, C., Gisder, S., Geiselhardt, S., Kretschmann, I., Bienefeld, K., Hilker, M. & Genersch, E. (2012). Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor*-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. *JExp Biol* 215(2):264– 271. DOI:10.1242/jeb.062562

- Schorkopf, D.L.P., Jarau, S., Francke, W., Twele, R., Zucchi, R., Hrncir, M., Schmidt, V. M., Ayasse, M. & Barth, F.G. (2007). Spitting out information: trigona bees deposit saliva to signal resource locations. *Proc. Royal Soc. B.* 274 (1611), 895–898. DOI:10.1098/rspb.2006.3766.
- Schuehly, W., Riessberger-Gallé, U. & Hernández López, J. (2021). Sublethal pesticide exposure induces larval removal behavior in honeybees through chemical cues, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 228, 113020, ISSN 0147-6513. DOI:10.1016/j.ecoenv.2021.113020.
- Schüler, V. *et al.* (2023). Significant, but not biologically relevant: *Nosema ceranae* infections and winter losses of honey bee colonies. *Commun. Biol.* 6, 229. DOI:10.1038/s42003-023-04587-7
- Sébastien, A., Lester, P.J., Hall, R.J., Wang, J., Moore, N.E. & Gruber, M.A.M. (2015). Invasive ants carry novel viruses in their new range and form reservoirs for a honeybee pathogen. *Biology Letters* 11(9):20150610. DOI:10.1098/rsbl.2015.0610.
- Seeley, T.D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4):287-293.
- Seeley, T.D. (1989). The honey bee colony as a superorganism. *Am. Sci.* 77, 546–553
- Seeley, T.D. (1995). *The Wisdom of the Hive: the Social Physiology of Honey Bee Colonies*. Harvard University Press, Cambridge, UK.
- Seeley, T.D. (2006). Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie* 38, 19–29. DOI:10.1051/apido:2006055.
- Seguridad Alimentaria Europea. (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetic acid. *EFSA J* 11, 57.
- Seide, V.E., Bernardes, R.C., Guedes Pereira, E.J. & Pereira Lima, M.A. (2018). Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ. Pollut.* 243B, 1854–1860.
- SENASA. (2019). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/estadisticas>
- Sguazza, G.H., Reynaldi, F.J., Galosi, C.M., & Pecoraro, R.M. (2013). Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virology Methods*, 194 (1–2), 102–106. DOI:10.1016/j.jviromet.2013.08.003
- Shafer, A.B. *et al.* (2015). Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends Ecol. Evol.* 30, 78–87.
- Sharma, A., Jha, P., Reddy, G.V.P. (2018). Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. *Sci. Total Environ.* 643, 1522–1532.
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. & Cox-Foster, D. (2005b). Intricate transmission routes and interactions between picornalike viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Virol* 86, 2281–2289.
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D. & Cui, L. (2005a). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology* 342: 141–149.
- Sheppard, W.S. & Meixner, M.D. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee sub-species from Central Asia. *Apidologie* 34:367-375. DOI:10.1051/apido:2003037
- Sheppard, W.S. & Smith, D.R. (2000). Identification of African-Derived Bees in the Americas: A Survey of Methods. *Entomological Society of America. Annals of the Entomological Society of America*, 93(2):159-176. DOI:10.1603/0013-8746(2000)093[0159:IOADBI]2.0.CO;2
- Sheppard, W.S. (2012). Honey bee genetic diversity and breeding – towards the reintroduction of European germplasm. *Am. Bee J.* 152, 155–158.

- Sheppard, W.S., Arias, M.C., Greech, A. & Meixner, M.D. (1997). *Apis mellifera rutneri*, a new honey bee sub-species from Malta. *Apidologie* 28:287-293. DOI:10.1051/apido:19970505
- Sheppard, W.S., Rinderer, T., Mazzoli, J., Stelzer, J. & Shimanuki, H. (1991). Gene flow between African- and European-derived honeybee populations in Argentina. *Nature* 349: 782–784.
- Sheppard, W.S., Rinderer, T.E., Garnery, L. & Shimanuki, H. (1999). Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. *Gen Mol Biol* 22: 73–75.
- Shi, M., Lin, X.D., Tian, J.H., Chen, L.J., Chen, X., Li, C.X., Qin, X.C., Li, J., Cao, J.P., Eden, J.S., *et al.* (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nat. Cell Biol.* 540, 539–543.
- Shimanuki, H. & Knox, D.A. (1991). Diagnosis of honey bee diseases. USDA Agricultural Handbook No. AH-690. Washington, DC, USA; 57 pp.
- Shimanuki, H. & Knox, D.A. (2000). Diagnosis of Honey Bee Diseases; No. AH-690; U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook: Washington, DC, USA.
- Shumkova, R., Georgieva, A., Radoslavov, G., Sirakova, D., Dzhebir, G., Neov, B., Bouga, M. & Hristov, P. (2018). The first report of the prevalence of *Nosema ceranae* in Bulgaria. *PeerJ*, 6, e4252, doi:10.7717/peerj.4252.
- Siede, R., Meixner, M.D., Almanza, M.T., Schoening, R., Maus, C. & Buechler, R. (2018). A long-term field study on the effects of dietary exposure of clothianidin to varroosis-weakened honey bee colonies. *Ecotoxicology* 27, 772–783. DOI:10.1007/s10646-018-1937-1
- Signorini, M., Molineri, A., Bulacio Cagnolo, N., Merke, J., Luiselli, S. & Caporgno, J. (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. DOI:10.14409/favecv.v9i1.1491.
- Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernandez-Ugalde, O., Mol, H.G.J., Ritsema, C.J., Geissen, V. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Sci. Total Environ.* 621, 1352–1359. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.10.093 PMID:29042088
- Simeunovic, P., Stevanovic, J., Cirkovic, D., Radojicic, S., Lakic, N., Stanisic, L., *et al.* (2014). *Nosema ceranae* and Queen Age Influence the Reproduction and Productivity of the Honey Bee Colony. *J. Apic. Res.* 53, 545–554. DOI: 10.3896/IBRA.1.53.5.09
- Simon Delso, N., Mędrzycki, P., Sgolastra, F., Fourrier, J., Azpiazu, C., Tosi, S. & Hatjina, F. (2022). Apitox - The COLOSS Task Force to Investigate the Impact of Pesticides on Bees. *Bee World*, 99:1. DOI: 10.1080/0005772X.2021.2016291
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., *et al.* (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34. DOI:10.1007/s11356-014-3470-y
- Simon-Delso, N., San Martin, G., Bruneau, E., Minsart, L.A., Mouret, C. & Hautier, L. (2014). Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. *PLoS ONE*, 9: e103073. DOI:10.1371/journal.pone.0103073
- Simone-Finstrom, M., Li-Byarlay, H., Huang, M.H., Strand, K.M., Rueppel, O. & Tarpy, D.R. (2016). Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Sci. Rep.* 6, 32023. DOI: 10.1038/srep32023
- Simone-Finstrom, M., Strand, M.K., Tarpy, D.R. & Rueppel, O. (2021). Impact of Honey Bee Migratory Management on Pathogen Loads and Immune Gene Expression is Affected by Complex Interactions With Environment, Worker Life History, and Season. *Journal of Insect Science*, 22(1): 17; 1–10 DOI:10.1093/jisesa/ieab096
- Singh, R., Levitt, A.L., Rajotte, E.G., Holmes, E.C., Ostiguy, N., vanEngelsdorp, D., Lipkin, W.I., Depamphilis, C.W., Toth, A.L. & Cox-Foster, D.L. (2010). RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One* 5:e14357 DOI:10.1371/journal.pone.0014357.

- Singh, S., Kumar, V., Datta, S., Wani, A.B., Dhanjal, D.S., Romero, R., *et al.* (2020). Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: a review. *Environ Chem Lett.* 18(3):663–702.
- Singla, A., Barmota, H., Sahoo, S.K. & Kang, B.K. (2021). Influence of neonicotinoids on pollinators: a review. *J. Apic. Res.* 60, 19–32. DOI:10.1080/00218839.2020.1825044
- Siviter, H., Bailes, E.J., Martin, C.D., Oliver, T.R., Koricheva, J., Leadbeater, E., *et al.* (2021). Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. *Nature* 596:389–392. DOI:10.1038/s41586-021-03787-7
- Smart, M.D. & Sheppard, W.S. (2012). *Nosema ceranae* in Age Cohorts of the Western Honey Bee (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 109, 148–151. DOI: 10.1016/j.jip.2011.09.009
- Smith, D.F.Q., Camacho, E., Thakur, R., Barron, A.J., Dong, Y., Dimopoulos, G., *et al.* (2021). Glyphosate inhibits melanization and increases susceptibility to infection in insects. *PLoS Biol* 19(5): e3001182. DOI:10.1371/journal.pbio.3001182
- Smith, D.R. & Brown, W. M. (1988). Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia* 44, 257–260. DOI:10.1007/BF01941730
- Smith, D.R., Palapoli, M.F., Taylor, B.R., Garnery, L., Cornuet, J.M., Solignac, M. & Brown, W.M. (1991). Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybee (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity* 82:96–100. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111062
- Smith, D.R., Taylor, O.R. & Brown, W.L. (1989). Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA. *Nature*, 339(6221), 213–215. DOI:10.1038/339213a0
- Smith, F.G. (1960). *Beekeeping in the Tropics*. Longmans, Green and Co., London.
- Smith, K.M., Loh, E.H., Rostal, M.K., Zambrana-Torrel, C.M., Mendiola, L. & Daszak, P. (2013). Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *EcoHealth* 10: 434–445. DOI:10.1007/s10393-013-0870-2 PMID:24496582
- Smith, M.L. (2012). The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? *PLoS ONE* 7, e43319.
- Snodgrass, R.E. (1956). *Anatomy of the honey bee*. Ithaca, NY: Comstock Pub. Associates. 334p.
- Solignac, M., Cornuet, J.M., Vautrin, D., Le Conte, Y., Anderson, D., Evans, J., Cros Arteil, S. & Navajas, M. (2005). The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honey bee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings. Biological Sciences*, 272: 411–419. DOI:10.1098/rspb.2004.2853
- Solignac, M., Vautrin, D., Pizzo, A., Navajas, M., Le Conte, Y. & Cornuet, J.M. (2003). Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Mol. Ecol. Notes* 3, 556–559.
- Southwick, E.E. & Southwick, L. (1992). Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the US 85(3):621–633. DOI:10.1093/jee/85.3.621
- Southwick, E.E., Roubik, D.W. & Williams, J.M. (1990). Comparative energy balance in groups of Africanized and European honey bees: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97, 1–7. DOI:10.1016/0300-9629(90)90713-3
- Spiltoir, C.F. & Olive, L.S. (1955). A re-classification of the genus *Pericystis* Betts. *Mycologia*; 47: 238–44
- Spivak, M. & Reuter, G.S. (1998). Honey bee hygienic behavior. *Am. Bee J.* 138, 283–286.
- Spivak, M. & Reuter, G.S. (1998). Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*. 29(3):291–302.
- Spivak, M., Reuter, G.S., Lee, K. & Ranum, B. (2009). The future of the MN Hygienic stock of bees in good hands. *Am. Bee J.* 149, 965–967.

- Stanimirovic, Z., Stevanovic, J. & Andjelkovic, M. (2005). Chromosomal diversity in *Apis mellifera carnica* from Serbia. *Apidologie* 36, 31–42.
- Staroň, M., Jurovčíková, J., Čermáková, T. & Staroňová, D. (2012). Scientific note on incidence of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in Slovakia during the years 2009 and 2010. *Slovak J. Anim. Sci.*, 45, 36–38, ISSN 1337-9984.
- Staveley, J.P., Law, S.A., Fairbrother, A. & Menzie, C.A. (2014). A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Human and Ecological Risk Assessment* 20: 566-591. PMID:243635549
- Steinhauer, N., vanEngelsdorp, D. & Saegerman, C. (2021). Prioritizing changes in management practices associated with reduced winter honey bee colony losses for US beekeepers. *Sci. Total Environ.* 753: 141629.
- Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Chantawannakul, H.H.P., Chauzat, M.P. & vanEngelsdorp, D. (2018). Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insects Science* 26:142-148. DOI:10.1016/j.cois.2018.02.004
- Stephenson, G.R. (2003). Pesticide Use and World Food Production: Risks and Benefits, in: *Proceedings of the 2000 National Meeting of the Expert Committee on Weeds Comité D'experts En Malherbologie*. pp. 261–270. DOI:10.1021/bk-2003-0853.ch015
- Stockstad, E. (2007). The case of the empty hives. *Science* 316 (5827): 970-972. DOI:10.1126/science.316.5827.970
- Stoner, K.A. & Eitzer, B.D. (2012). Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS One* 7:e39114. DOI:10.1371/journal.pone.0039114
- Strapazzon, R., Carneiro, F.E., Guerra, J.C.V. & Moretto, G. (2009). Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 8, 990–997.
- Straub, L., Minnameyer, A., Camenzind, D., Kalbermatten, I., Tosi, S., Van Oystaeyen, A., Wäckers, F., Neumann, P. & Strobl, V. (2022). Thiamethoxam as an inadvertent anti-aphrodisiac in male bees, *Toxicology Reports*, Volume 9, Pages 36-45, ISSN 2214-7500. DOI:10.1016/j.toxrep.2021.12.003.
- Straub, L., Minnameyer, A., Strobl, V., Kolari, E., Friedli, A., Kalbermatten, I., *et al.* (2020). From antagonism to synergism: extreme differences in stressor interactions in one species. *Sci. Rep.* 10:4667. DOI:10.1038/s41598-020-61371-x
- Straub, L., Villamar-Bouza, L., Bruckner, S., Chantawannakul, P., Gauthier, L., Khongphinitbunjong, K., *et al.* (2016). Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283:20160506. DOI:10.1098/rspb.2016.0506
- Strauss, U. *et al.* (2013). Seasonal prevalence of pathogens and parasites in the savannah honeybee (*Apis mellifera scutellata*). *J. Invertebr. Pathol.* 114, 45–52. DOI:10.1016/j.jip.2013.05.003
- Strauss, U., Dietemann, V., Human, H., Crewe, R. M. y Pirk, C. W. (2016). Resistance rather than tolerance explains survival of savannah honeybees (*Apis mellifera scutellata*) to infestation by the parasitic mite *Varroa destructor*. *Parasitology*, 143(3), 374-387.
- Strauss, U., Pirk, C.W.W., Crewe, R.M., Human, H. & Dietemann, V. (2015). Impact of *Varroa destructor* on honeybee (*Apis mellifera scutellata*) colony development in South Africa. *Exp. Appl. Acarol.* 65, 89–106. DOI:10.1007/s10493-014-9842-7.
- Submitter, E.S.I.C., Tomás, B., Elena, A., Alberto, G. & José, P. (2020). Typology and Characterization of the Pampean Beekeeping Systems. *ESIC Market Economics and Business Journal*, 51(2), 299-318
- Sur, R., Stork, A. & Ag, B.C. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insectol.* 56, 35–40.
- Susevich, M.L., Genchi García, M.L., Bravi, M.E., Echeverría, M.G. & Reynaldi, F.J. (2021). RNA virus circulation among pollinator and non-pollinator species in Argentina. *Ecología Austral* 31:413-419. DOI: 10.25260/EA.21.31.3.0.1508
- Sušnik, S., Kozmus, P., Poklukar, J. & Meglic, V. (2004). Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*, 35, 623–636.

- Swanson, J.A.I., Torto, B., Kells, S.A., Mesce, K.A., Tumlinson, J.H. & Spivak, M. (2009). Odorants that Induce Hygienic Behavior in Honeybees: Identification of Volatile Compounds in Chalkbrood-Infected Honeybee Larvae. *J. Chem. Ecol.* 35, 1108–1116.
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* 13: 204–216.
- Tabak, M.A., Piaggio, A.J., Miller, R.S., Sweitzer, R.A. & Ernest, H.B. (2017). Anthropogenic factors predict movement of an invasive species. *Ecosphere* 8, e01844
- Takamatsu, D., Morinishi, K., Arai, R., Sakamoto, A., Okura, M. & Osaki, M. (2014). Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different *Apis* species. *Vet. Microbiol.* 171: 221–226.
- Tanaskovic, M., Eric, P., Patenkovic, A., Eric, K., Mihajlovic, M., Tanasic, V., Stanisavljevic, L. & Davidovic, S. (2021). MtDNA Analysis Indicates Human-Induced Temporal Changes of Serbian Honey Bees Diversity. *Insects*, 12, 767
- Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P. & Terio, V. (2015). Virus Infections of Honeybees *Apis mellifera*. *Ital. J. Food Safety*, 4, 5364.
- Tarpy, D.R. (2003). Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings. Biol. Sci.* 270, 99–103
- Tarpy, D.R., vanEngelsdorp, D. & Pettis, J.S. (2013). Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften*, 100(8), 723–728.
- Tarr, H.L.A. (1937). Studies on American foul brood of bees: the relative pathogenicity of vegetative cells and endospores of bacillus larvae for the brood of the bee. *Annals of Applied Biology* 24 (2): 377–384. DOI:10.1111/j.1744-7348.1937.tb05040.x.
- Tauber, J.P., Collins, W.R., Schwarz, R.S., Chen, Y., Grubbs, K., Huang, Q., Lopez, D., Peterson, R. & Evans, J.D. (2019). Natural Product Medicines for Honey Bees: Perspective and Protocols. *Insects*, 10, 356
- Taylor, O.R. & Spivak, M. (1984). Climatic limits of tropical African honey bees in the Americas. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 53, 157–165
- Taylor, O.R. (1977). The Past and Possible Future Spread of Africanized Honeybees in the Americas. *Bee World* 58(1): 19–30
- Taylor, O.R. (1988). Ecology and economic impact of African and Africanized honey bees. In: GR Needham, RE Page, M Delfinado Baker & CE Bowman (Eds), *Africanized honey bees and bee mites* (pp.29–41). Chichester, UK: Ellis Horwood
- Techer, M.A., Clémencet, J., Simiand, C., Preaduth, S., Azali, H.A., Reynaud, B., *et al.* (2017). Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee *Apis mellifera* populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands. *BMC Genet.* 18: 53. DOI:10.1186/s12863-017-0520-8 PMID: 28577537
- Tehel, A., Brown, M.J.F. & Paxton, R.J. (2016). Impact of managed honey bee viruses on wild bees. *Curr Opin Virol* 19, 16–22.
- Tehel, A., Vu, Q., Bigot, D., Gogol-Döring, A., Koch, P., Jenkins, C., Doublet, V., Theodorou, P. & Paxton, R. (2019). The two prevalent genotypes of an emerging equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees. *Viruses*, 11, 114.
- Teixeira, E.W., Chen, Y., Message, D., Boncristiani, H., Pettis, J. & Evans, J. (2012). Israeli acute paralysis virus in Africanized honey bees in southeastern Brazilian apiaries. *J. Apic. Res.* 51, 282–284
- Teixeira, E.W., Chen, Y., Message, D., Pettis, J. & Evans, J.D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 117–119

- Tentcheva, D., Gauthier, L., Bagny, L., Fievet, J., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E. & Bergoin, M. (2006). Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor*. *Apidologie* 37(1):1-7. DOI:10.1051/apido:2005057
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Jouve, S., Canabady-Rochelle, L., Dainat, B., *et al.* (2004b). Polymerase Chain Reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* 35: 431–439.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E. & Bergoin, M. (2004a). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7185–7191.
- Tesovnik, T., Zorc, M., Gregorc, A., Rinehart, T., Adamczyk, J. & Narat, M. (2019). Immune gene expression in developing honey bees (*Apis mellifera* L.) simultaneously exposed to imidacloprid and *Varroa destructor* in laboratory conditions, *Journal of Apicultural Research*, DOI:10.1080/00218839.2019.1634463
- Tesovnik, T., Zorc, M., Ristanić, M., Glavinić, U., Stevanović, J., Narat, M. & Stanimirović, Z. (2020). Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees, *Environmental Pollution*, Volume 256, 113443, ISSN 0269-7491. DOI:10.1016/j.envpol.2019.113443.
- Thompson, C.E., Biesmeijer, J.C., Allnutt, T.R., Pietravalle, S. & Budge, G.E. (2014). Parasite Pressures on Feral Honey Bees (*Apis mellifera* sp.). *PLoS ONE* 9(8):e105164. DOI:10.1371/journal.pone.0105164
- Thompson, H.M., Levine, S.L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P. & von Merey, G. (2014). Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integrated Environ. Assess. Manag.* (3), 463–470
- Thompson, T.S., Van den Heever, J.P. & Limanowka, R.E. (2019). Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 36 (3), 434–446
- Thomson, D.M. (2016). Local bumble bee decline linked to recovery of honey bees, drought effects on floral resources. *Ecology Letters*. 19: 1247–1255.
- Tibatá, V.M., Arias, E., Corona, M., Botero, F.A., Figueroa-Ramírez, J. & Junca, H. (2018a). Determination of the Africanized mitotypes in populations of honey bees (*Apis mellifera* L.) of Colombia. *J Apic Res.* 57: 219–227. DOI:10.1080/00218839.2017.1409065
- Tibatá, V.M., Junca, H., Sánchez, A., Corona, M., Ariza Botero, F. & Figueroa, J. (2018b). Molecular detection of *Melissococcus plutonius* assessed in Africanized honey bee populations (*Apis mellifera*) in three regions of Colombia, *Journal of Apicultural Research*, DOI:10.1080/00218839.2018.1439151
- Tibatá, V.M., Sanchez, A., Palmer-Young, E., Junca, H., Solarte, V.M., Madella, S., Ariza, F., Figueroa, J., & Corona, M., (2021). Africanized honey bees in Colombia exhibit high prevalence but low level of infestation of *Varroa* mites and low prevalence of pathogenic viruses. *PLoS ONE*, 16(5), e0244906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244906>
- Tihelka, E., Cai, C., Pisani, D. *et al.* (2020). Mitochondrial genomes illuminate the evolutionary history of the Western honey bee (*Apis mellifera*). *Sci Rep* 10, 14515. DOI:10.1038/s41598-020-71393-0
- Tison, L., Hahn, M.-L., Holtz, S., Rössner, A., Greggers, U., Bischoff, G. & Menzel, R. (2016). Honey Bees Behavior Is Impaired by Chronic Exposure to the Neonicotinoid Thiacloprid in the. DOI:10.1021/acs.est.6b02658
- Tlak Gajger, I., Šimenc, L. & Toplak, I. (2021). The First Detection and Genetic Characterization of Four Different Honeybee Viruses in Wild Bumblebees from Croatia. *Pathogens* 10, 808.
- Todd, J.H., Ball, B.V. & de Miranda, J.R. (2004). Identifying the viruses causing mortality of honey bees in colonies infested with *Varroa destructor*. *Surveillance* 31(4):22–25
- Tokarev, Y.S., Huang, W.F., Solter, L.F., Malysh, J.M., Becnel, J.J. & Vossbrinck, C.R. (2020). A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J. Invertebr. Pathol.* 169, 7. DOI: 10.1016/j.jip.2019.107279

- Tomé, H.V.V., Schmehl, D.R., Wedde, A.E., Godoy, R.S.M., Ravaiano, S.V., Guedes, R.N.C., *et al.* (2020). Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environ Pollut* 256:113420. DOI:10.1016/j.envpol.2019.113420 PMID:31813703
- Tompson, J.N. (1994). *The coevolutionary process*. University of Chicago Press.
- Tong, Z., Duan, J., Wu, Y., Liu, Q., He, Q., Shi, Y., *et al.* (2018). A survey of multiple pesticide residues in pollen and bee bread collected in China. *Sci. Total Environ.* DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.04.424
- Toplak, I., Jamnikar Ciglenečki, U., Aronstein, K. & Gregorc, A. (2013). Chronic Bee Paralysis Virus and *Nosema ceranae* experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Viruses* 5: 2282–2297.
- Toplak, I., Rihtarič, D., Ciglenečki, U.J., Hostnik, P., Jenčič, V. & Barlič-Maganja, D. (2012) Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies in Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov. Vet. Res.* 49, 89–96.
- Tosi, S., Sfeir, C., Carnesecchi, E., vanEngelsdorp, D. & Chauzat, M.-P. (2022). Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. *Science of The Total Environment*, Volume 844, 156857, ISSN 0048-9697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.156857.
- Traver, B.E. & Fell, R.D. (2011a). *Nosema ceranae* in Drone Honey Bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 107, 234–236. DOI: 10.1016/j.jip.2011.05.016
- Traver, B.E. & Fell, R.D. (2011b). Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J. Invertebr. Pathol.* 107: 43–49. DOI:10.1016/j.jip.2011.02.003.
- Traynor, K.S., Mondet, F., de Miranda, J.R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M.A.Y., Chantawannakul, P. & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in Parasitology* 36 (7), 592–606. DOI:10.1016/j.pt.2020.04.004.
- Traynor, K.S., Pettis, J.S., Tarpy, D.R., Mullin, C.A., Frazier, J.L., Frazier, M. & vanEngelsdorp, D. (2016). In-hive pesticide exposome: assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Sci. Rep.* 6: 33207.
- Traynor, K.S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., Madella, S., Evans, J., Lopez, D. & van Engelsdorp, D. (2016). Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* 47, 325–347.
- Tritschler, M., Retschnig, G., Yañez, O., Williams, G.R. & Neumann, P. (2017). Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*. *Ecol. Evol.* 7, 1850–1857.
- Tritschler, M., Vollmann, J.J., Yañez, O., Chejanovsky, N., Crailsheim, K. & Neumann, P. (2017). Protein nutrition governs within-host race of honey bee pathogens. *Scientific Reports* 7, 14988.
- Troemel, E.R. & Madhani, H.D. (2011). New models of microsporidiosis: infections in zebrafish, *C. elegans*, and honey bee. *PLoS Pathology*, 7: e1001243. DOI:10.1371/journal.ppat.1001243
- Truitt, L. L., McArt, S. H., Vaughn, A. H. & Ellner, S. P. (2019). Trait-based modeling of multihost pathogen transmission: Plant–pollinator networks. *Am. Nat.* 193, E149–E167
- Trüper, H.G. & de Clari, L. (1998). Taxonomic Note: Erratum and Correction of Further Specific Epithets Formed as Substantives (Nouns) 'in Apposition'. *Int. J. Syst. Evol.* 48, 615.
- Turnbull, L.H.A. (2010). Applied ecology: how to get even with pests. *Nature* 466(7302):36–7. DOI:10.5167/uzh-35625 PMID:20596003
- Ueira-Vieira, C., Oliveira-Almeida, L., Correade Almeida, F., Marques, I., Brandemburgo, M.A.M. & Onetti, A.M. (2015). Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. *Apidologie* 46:628–630. DOI:10.1007/s13592-015-0353-2
- Upegui, S. (2010). Evaluación de mezclas de compost inmaduro/suelo de Moravia, y fuentes de nutrientes, para la degradación de los pesticidas Clorpirifós, Malatión y Metil Paratión. Universidad de Medellín, Medellín (Tesis de Maestría)

- Urbieta-Magro, A., Higes, M., Meana, A., Barrios, L. & Martín-Hernández, R. (2019). Age and Method of Inoculation Influence the Infection of Worker Honey Bees (*Apis mellifera*) by *Nosema ceranae*. *Insects* 2019, 10, 417.
- Uzunov, A., Meixner, M.D., Kiprijanovska, H., Andonov, S., Gregorc, A., Ivanova, E., Bouga, M., Dobi, P., Büchler, R. & Francis, R. (2014). Genetic structure of *Apis mellifera macedonica* in the Balkan Peninsula based on microsatellite DNA polymorphism. *J. Apic. Res.*, 53, 288–295.
- Vale, J.A. (1998). Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorous Insecticide Poisoning. *Toxicology Letters*. 102:649-52.
- van Alphen, J.J.M. & Fernhout B.J. (2020). Natural selection, selective breeding, and the evolution of resistance of honeybees (*Apis mellifera*) against Varroa. *Zoological Letters* 6:6. DOI:10.1186/s40851-020-00158-4
- Van Baalen, M. & Beekman, M. (2006). The Costs and Benefits of Genetic Heterogeneity in Resistance against Parasites in Social Insects. *Am. Nat.* 167, 568–577.
- van der Sluijs, J.P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bijleveld van Lexmond, M.F.I.J., Bonmatin, J.-M., Chagnon, M., *et al.* (2015). Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 148–154. DOI:10.1007/s11356-014-3229-5
- Van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charriere, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Crailsheim, K., Dahle, B., Gajda, A., Gray, A., Drazic, M., Higes, M., Kauko, L., Kence, A., Kence, M., Kezic, N., Kiprijanovska, H., Kralj, J., Kristiansen, P., Martin-Hernandez, R., Mutinelli, F., Nguyen, K., Otten, C., Ozkirim, A., Pernal, S.F., Peterson, M., Ramsay, G., Santrac, V., Soroker, V., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wei, S. & Wilkins, S. (2012). Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-2009 and 2009-2010. *Journal of Apicultural Research* 51(1): 100-114. DOI:10.3896/IBRA.1.51.1.12
- Van Dooremalen, C., Stam, E., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J., van Langevelde, F. & Blacquière, T. (2013). Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of Insect Physiology* 59 (4), 487 – 493. DOI:10.1016/j.jinsphys.2013.02.006
- Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1, 1–30
- Vanbergen, A.J. (2013). Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Front. Ecol. Environ.* 11: 251–259
- Vandame, R. & Palacio, M.A. (2010). Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping?. *Apidologie* 41 (3), 243–255.
- Vandame, R., Colin, M-E, Morand, S. & Otero-Colina, G. (2000). Levels of compatibility in a new host-parasite association: *Apis mellifera*/*Varroa jacobsoni*. *Can J Zool.* 78(11):2037–44.
- Vandame, R., Morand, S., Colin, M.E. & Belzunces, L.P. (2002). Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantify ing costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 33 (5):433–445. DOI:10.1051/apido:2002025
- vanEngelsdorp, D. & Meixner, M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S80-S95. DOI:10.1016/j.jip.2009.06.011
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R. & Pettis, J.S. (2009). Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4: e6481. DOI:10.1371/journal.pone.0006481
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R.M. & Pettis, J. (2008). A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring. *PLoS One* 3(12):e4071. DOI:10.1371/journal.pone.0004071
- VanEngelsdorp, D., Tarpy, D.R., Lengerich, E.J. & Pettis, J.S. (2013). Idiopathic brood disease syndrome and queen events as precursors of colony mortality in migratory beekeeping operations in the eastern United States. *Prev. Vet. Med.* 108, 225–233

- vanEngelsdorp, D., Traynor, K.S., Andree, M., Lichtenberg, E.M., Chen, Y., Saegerman, C. & Cox-Foster, D.L. (2017). Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PLoS ONE*, 12: e0179535. DOI:10.1371/journal.pone.0179535
- Varela, M., Spencer, T.E., Palmarini, M. & Arnaud, F. (2009). Friendly viruses: the special relationship between endogenous retroviruses and their host. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1178, 157–72.
- Varis, A.L., Ball, B.V. & Allen, M. (1992). The incidence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Finland and Great Britain, *Apidologie*, 23, 133–137. DOI:10.1051/apido:19920205
- Vaziritabar, S., Aghamirkarimi, A. & Mehdi, S. (2016). Evaluation of the defensive behavior in two honeybee races Iranian honeybee (*Apis mellifera meda*) and Carniolan honeybee (*Apis mellifera carnica*) and grooming behavior of different bee races in controlling *Varroa destructor* mite in honey. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4(5), 586-602
- Vejnovic, B., Stevanovic, J., Schwarz, R.S., Aleksic, N., Mirilovic, M., Jovanovic, N.M. & Stanimirovic, Z. (2018). Quantitative PCR Assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* Colonies Co-Infected Naturally with *Nosema ceranae*. *J. Invert. Pathol.*, 151, 76–81.
- Vercelli, M., Novelli, S., Ferrazzi, P., Lentini, G. & Ferracini, C. (2021). A qualitative analysis of beekeepers' perceptions and farm management adaptations to the impact of climate change on honey bees. *Insects* 12, 228
- Verde, M., Demedio, J. & Gómez, T. (2013). *Apicultura, Salud y Producción: Guía Técnica para el Apicultor*. La Habana, Cuba: Consejo Científico Veterinario de Cuba.
- Verde, M.M. (2014). *Apicultura y seguridad alimentaria*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1), 25-31. <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193030122008.pdf>
- Vergara, C., Dietz, A. & Perez de Leon, A. (1993). Female parasitism of European honey bees by Africanized honey bee swarms in Mexico. *Journal of Apicultural Research*. 32: 34–40.
- Veselý, V., Kubišová, S., Haragsim, O., Kamler, K., Krieg, P., Škrobal, D., Ptáček, V., Titěra, D., Peroutková, M., Drobníková, V., *et al.* (2003). *Beekeeping*; Brázda: Praha, Czech Republic, p. 272.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P. & Delbac, F. (2011). Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6, e21550. DOI:10.1371/journal.pone.0021550
- Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D.G., Belzunces, L.P., Le Gall, M., Broussard, C., Delbac, F. & El Alaoui, H. (2014). Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J. Invertebr. Pathol.* 121, 89–96, DOI:10.1016/j.jip.2014.07.002
- Vilarem, C., Piou, V., Vogelweith, F., & Vétillard, A. (2021). *Varroa destructor* from the laboratory to the field: Control, biocontrol and IPM perspectives - A Review. *Insects*, 12(9), 800. DOI:10.3390/insects12090800.
- Villa, J.D., Bourgeois, A.L. & Danka, R.G. (2013). Negative Evidence for Effects of Genetic Origin of Bees on *Nosema ceranae*, Positive Evidence for Effects of *Nosema ceranae* on Bees. *Apidologie* 44, 511–518. DOI: 10.1007/s13592-013-0201-1
- Villa, J.D., Danka, R.G., & Harris, J.W. (2009). Simplified methods of evaluating colonies for levels of *Varroa* sensitive hygiene (VSH). *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 48, 162–167. DOI:10.3896/IBRA.1.48.3.03
- Villaneuva, G.R. & Roubik, D.W. (2004). Why are African honey bees and not European bees invasive? Pollen diet diversity in community experiments. *Apidologie*. 35: 481–491.
- Vivas Espinoza, J.L. (2015). Prevalencia de nosema (*Nosema* spp.) en colmenares de la región norte y centro norte del Ecuador. Tesis de Grado para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ingeniería Agronómica. Quito: UCE. 64 pp.
- Wainselboim, A.J. (2003). La trofalaxia en el marco de la recolección de néctar en la abeja doméstica *Apis mellifera*: la dinámica de la transferencia en función de la experiencia del individuo recolector. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3564_Wainselboim.pdf

- Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N. & Pirk, C.W. (2014). A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature genetics*, 46(10), 1081. DOI:10.1038/ng.3077.
- Wallner, K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30, 235–248.
- Walsh, P.S., Metzger, D A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10, 506–513. DOI: 10.2144/000113897.
- Walton, A. & Toth, A.L. (2016). Variation in individual worker honey bee behavior shows hallmarks of personality. *Behavioral ecology and sociobiology*, 70(7):999-1010.
- Wang, S., Chen, G., Lin, Z., Wu, Y., Hu, F. & Zheng, H. (2019). Occurrence of multiple honeybee viruses in the ectoparasitic mites *Varroa* spp. in *Apis cerana* colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* 166, 107225.
- Wang, X., Sun, S.Y., Lu, J.L. & Bao, J. (2019). Remediating chlorpyrifos-contaminated soil using immobilized microorganism technology. *Polish Journal of Environmental Studies*, (28)1, 349-357. DOI:10.15244/pjoes/83669
- Wanzala, W. & Ogoma, S.B. (2013). Chemical composition and mosquito repellency of essential oil of *Tagetes minuta* from the southern slopes of Mount Elgon in western Kenya. *J. Essent. Oil. Bear. Pl.* 16, 216–232.
- Wasim, A., Dwaipayan, S. & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, núm. 1, vol. 2.
- Watson, K. & Stallins, A.J. (2016). Honey bee and Colony Collapse Disorder: A pluralistic reframing. *Geography Compass*, 10: 222-236. DOI:10.1111/gec3.12266
- Webster, T.C. (1993). *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.* 133, 869–870.
- Weselak, M., Arbuckle, T. & Foster, W. (2007). Pesticide Exposures and Developmental Outcomes: The Epidemiological Evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B.* 10:41-80.
- White, G.F. (1912). The cause of European foul brood. U.S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Government Printing Office: Washington, DC, USA. Circular No. 157, p. 1-15.
- White, G.F. (1913). Sacbrood, a Disease of Bees. US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Washington.
- White, G.F. (1920). European foulbrood. U.S. Department of Agriculture, Bulletin No. 810, p. 1-48.
- Whitfield, C., Behura, S., Berlocher, S., Clark, A., Johnston, S., Sheppard, W., *et al.* (2006). Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799), 642-645, DOI:10.1126/science.1132772
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H.C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S.J.M. & Boots, M. (2016). Honeybee disease: deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* (80-.) 351, 594–597. DOI:10.1126/science.aac9976.
- Wilkins, S., Brown, M.A. & Cuthbertson, A.G.S. (2007). The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest Management Science* 63: 1062–1068. DOI:10.1002/ps.1461.
- Williams, G., Shafer, A., Rogers, R., Shutler, D. & Stewart, D. (2008). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97: 189–192.
- Wilson, E.O. (1971a). *The Insect Societies* (Harvard Univ. Press, 1971).
- Wilson, W.T. (1971b). Resistance to American foulbrood in honey bees. XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology* 17 (2): 247–255. DOI:10.1016/0022- 2011(71)90099-1.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H. & Starks, P.T. (2009). Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual review of entomology*, 54, 405-423.

- Winston, M.L. (1979). Intra-colony demography and reproductive rate of the Africanized honeybee in South America. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 4(3):279-292.
- Winston, M.L. (1987) The biology of the honey bee, Harvard University Press.
- Winston, M.L. (1992). The biology and management of Africanized honey bees. *Annual Review of Entomology*. 37: 173–193. DOI:10.1146/annurev.en.37.010192.001133
- Winston, M.L., Dropkin, J. & Taylor, O.R. (1981). Demography and life history characteristics of two honey bee races (*Apis mellifera*). *Oecologia*. 48: 407–413.
- Winston, M.L., Taylor, O.R. & Otis, G.W. (1983). Some differences between temperate European and tropical African and South American honey bees. *Bee World*. 64: 12–21.
- Wiredu-Boakye, D. *et al.* (2017). Decay of the glycolytic pathway and adaptation to intranuclear parasitism within Enterocytozoonidae Microsporidia. *Environ. Microbiol.* 19, 2077–2089
- Wood, S.C., de Mattos, I.M., Kozii, I.V., Klein, C.D., Dvylyuk, I., Folkes, C.D.A., de Carvalho Macedo Silva, R., Moshynskyy, I., Epp, T. & Simko, E. (2020). Effects of chronic dietary thiamethoxam and prothioconazole exposure on *Apis mellifera* worker adults and brood. *Pest Manag. Sci.* 76, 85–94. DOI:10.1002/ps.5501.
- Wood, T. J. & Goulson, D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 17285–17325. DOI:10.1007/s11356-017-9240-x
- Wood, T. J., Kaplan, I., Zhang, Y. & Szendrei, Z. (2019). Honeybee dietary neonicotinoid exposure is associated with pollen collection from agricultural weeds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286:20190989. DOI:10.1098/rspb.2019.0989
- Woodcock, B.A., Bullock, J.M., Shore, R.F., Heard, M.S., Pereira, M.G., Redhead, J., Ridding, L., Dean, H., Sleep, D., Henrys, P., Peyton, J., Hulmes, S., Hulmes, L., Sarospataki, M., Saure, C., Edwards, M., Genersch, E., Knabe, S. & Pywell, R.F. (2017). Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science* 356, 1393e1395.
- Woodford, L., Christie, C.R., Campbell, E.M., Budge, G.E., Bowman, A.S. & Evans, D.J. (2022). Quantitative and Qualitative Changes in the Deformed Wing Virus Population in Honey Bees Associated with the Introduction or Removal of *Varroa destructor*. *Viruses* 14, 1597. DOI:10.3390/10.3390/v14081597
- Woolhouse, M.E., Taylor, L.H. & Haydon, D.T. (2001). Population biology of multihost pathogens. *Science* 292, 1109–12.
- Wray, M.K., Mattila, H.R. & Seeley, T.D. (2011). Collective personalities in honeybee colonies are linked to colony fitness. *Animal Behaviour*, 81(3):559-568.
- Wu, J., Zhou, C., Wu, P., Xu, J., Guo, Y., Xue, F., Getachew, A. & Xu, S. (2017). Brain metabolomic profiling of eastern honey bee (*Apis cerana*) infested with the mite *Varroa destructor*. *PLoS ONE* 12, e0175573
- Xonis, C., Thrasyvoulou, A. & Taj, H. (2015). Variability of hygienic behavior in bee *Apis mellifera macedonica*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 21(3), 674-679.
- Yamada, T., Kremer, R.J., de Camargo e Castro, P.R. & Wood, B.W. (2009). Glyphosate interactions with physiology, nutrition, and diseases of plants: threat to agricultural sustainability? *Eur. J. Agron.* 31, 111–113
- Yang, D., Xu, X., Zhao, H., Yang, S., Wang, X., Zhao, D., Diao, Q. & Hou, C. (2018). Diverse Factors Affecting Efficiency of RNAi in Honey Bee Viruses. *Front. Genet.* 9:384. DOI: 10.3389/fgene.2018.00384
- Yang, X. & Cox-Foster, D.L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 7470–7475.
- Yañez, O., Piot, N., Dalmon, A., de Miranda, J.R., Chantawannakul, P., Panziera, D., Amiri, E., Smagghe, G., Schroeder, D. & Chejanovsky, N. (2020). Bee viruses: routes of infection in hymenoptera. *Front Microbiol* 11:943. DOI:10.3389/fmicb.2020.00943
- Yañez, O., Tejada, G. & Neumann, P. (2014). First detection of viruses in africanized honey bees from Peru. *Virol. Sin.* 5 , 321–323

- Yordanova, M., Evison, S.E.F., Gill, R.J. & Graystock, P. (2022). The threat of pesticide and disease co-exposure to managed and wild bee larvae. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 17: 319–326. DOI:10.1016/j.ijppaw.2022.03.001
- Yoshiyama, M. & Kimura, K. (2011). Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 263–267
- Yousefi, B. & Fouks, B. (2019). The presence of a larval honey bee parasite, *Ascosphaera apis*, on flowers reduces pollinator visitation to several plant species. *Acta Oecol.* 96, 49–55. DOI:10.1016/j.actao.2019.03.006
- Yue, C., Schröder, M., Bienefeld, K. & Genersch, E. (2006). Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J Invertebr Pathol* 92:105–108. DOI:10.1016/j.jip.2006.03.001
- Yue, D. *et al.* (2008). Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 10 (6): 1612–1620. DOI:10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x
- Zachary, S., Lamas, S.S., Ryabov, E.V., Mowery, J., Heermann, M., Sonenshine, D., Evans, J.D., Hawthorne, D.J. (2022). Promiscuous feeding across multiple honey bee hosts amplifies the vectorial capacity of *Varroa destructor*. *bioRxiv* 2022.05.05.490834. DOI:10.1101/2022.05.05.490834
- Zander, E. & Bottcher, F.K. (1984). *Krankheiten der Biene*, 7th ed.; Eugen Ulmer: Stuttgart, Germany.
- Zander, E. (1909). Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenztg.* 31, 196–204
- Zárate, D., Lima, T.G., Poole, J.D., Calfee, E., Burton, R.S., & Kohn, J.R. (2022). Admixture in Africanized honey bees (*Apis mellifera*) from Panamá to San Diego, California (U.S.A.). *Ecology and Evolution*, 12, e8580. DOI:10.1002/ece3.8580
- Zayed, A. & Whitfield, C.W. (2008). A genome-wide signature of positive selection in ancient and recent invasive expansions of the honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(9):3421-6. DOI:10.1073/pnas.0800107105
- Zhao, H., Li, G., Guo, D., Wang, Y., Liu, Q., Gao, Z., Wang, H., Liu, Z., Guo, X., Xu, B. (2020). Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Sci. Total Environ.* 744, 140819. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.140819 PMID:32693280
- Zhao, Y., Heerman, M., Peng, W., Evans, J.D., Rose, R., De Grandi Hofman, G., Simone-Finstrom, M., Li, J., Li, Z., Cook, S.C., Su, S., Rodríguez-García, C., Banmeke, O., Hamilton, M. & Chen, Y. (2019). The dynamics of deformed wing virus concentration and host defensive gene expression after Varroa mite parasitism in honey bees *Apis mellifera*. *Insects* 10(1):16. DOI:10.3390/insects10010016
- Zheng, H., Lin, Z., Huang, S., Sohr, A., Wu, L. & Chen, Y.P. (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, 2037–44.
- Zhu, W., Schmehl, D.R., Mullin, C.A. & Frazier, J.L. (2014). Four common pesticides, their mixture and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS ONE* 9(1): e77547. DOI:10.1371/journal.pone.0077547 PMID:24416121
- Zhu, Y.C., Guo, Z., He, Y. & Luttrell, R. (2012). Microarray analysis of gene regulations and potential association with acephate-resistance and fitness cost in *Lygus lineolaris*. *PLoS ONE* 7 (5), e37586. DOI:10.1371/journal.pone.0037586 PMID: 22655059
- Zhu, Y.C., Snodgrass, G.L. & Chen, M.S. (2004). Enhanced esterase gene expression and activity in a malathion-resistant strain of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 1175–1186. DOI:10.1016/j.ibmb.2004.07.008 PMID: 15522613
- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J. & Luttrell, R. (2017a). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honeybee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS One* 12, e0178421.

- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J. & Luttrell, R. (2017b). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). PLoS ONE 12(5), e0176837.
- Zioga, E., White, B. & Jane, C. (2022). Glyphosate used as desiccant contaminates plant pollen and nectar of non-target plant species. Heliyon 8 e12179. DOI:10.1016/j.heliyon.2022.e12179
- Zoller, O., Rhyn, P., Rupp, H., Zarn, J.A. & Geiser, C. (2018). Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. Food Addit. Contam. B 11, 83–91.

AGRADECIMIENTOS

A mi abu Lidia, por ser mi pilar y haberme acompañado siempre con una palabra cálida, una caricia amable y un amor inconmensurable.

A Belchi, quién más confía en mí, mi compañera de vida, por ser mi cómplice y mi gran sostén. Mi bastión siempre.

A mis padres, Luis y Mirta, sin quienes no estaría acá de ninguna manera posible, por el acompañamiento y la guía que son para mi vida.

A toda mi familia por el apoyo y el acompañamiento en todos estos años.

A mis directores Claudio y Francisco por su paciencia y por haber sido grandes maestros. A Francisco por abrirme las puertas del mundo apícola y a Claudio por ser un gran mentor y depositar su confianza en mí.

A la Universidad Nacional de La Plata y la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, por haberme permitido realizar este doctorado de manera gratuita, en especial a la Secretaría de Posgrado por el acompañamiento y a Vero Ribelotta, Pato Kavanagh, Ale Luna y Fer Esnaola por su gran calidez humana.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el otorgamiento de las becas que me permitieron realizar este trabajo de doctorado.

Al IMBICE, a la cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, a la cátedra de Producción de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán y a la cátedra de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata por prestarme sus instalaciones para realizar este trabajo de doctorado.

A Anne Dalmon, Yves Le Conte, Alexis Beaupaire y al Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) por haber contribuido de manera significativa en mi formación profesional.

A Graciela Albo, Hernán Sguazza, Daniel Leniz, Alejandro Grattoni, Verónica Albarracín, Claudio Leguizamón, Marco Tizzano y Raúl Pérez, por haber sido indispensables para desarrollar parte de los experimentos y haber sido siempre una gran compañía y apoyo.

A mis compañeros del IMBICE que hacen todo más ameno, en especial a Graciela Bailliet por su acompañamiento incondicional y a Mariela Cuello por haber sido un gran apoyo, y ser más que compañera, familia.

A mis compañeros de Veterinaria, particularmente a Marquitos Salina, mi gran compañero y querido amigo, que ha sido un gran apoyo y un inestimable complemento, a Gise Barbisan, mi primera "maestra" en tareas de laboratorio, pero sobre todo, una gran persona, y a las directoras del laboratorio de virología, Cecilia Galosi y Gabriela Echeverría, que siempre tuvieron una actitud receptiva y de acompañamiento.

A mis colegas Laura Alarcón, por su inconmensurable colaboración, y especialmente a mi querida uru, Lore Castelli, gran compañera y amiga.

A mis queridos compañeros extensionistas, que comparten sus saberes conmigo, en especial a mi querida colega Maricel Vega.

A mis amigos, a todos y cada uno, que siempre están y para quienes la regla general en estos últimos años fue la postergación. A mis amigos de la vida. A mis amigos de la facu Santi, Adri, Ger, Euge, Ailu, Flor, Nati, particularmente a Panchi, Seba, Ale, Pablito, Ro, Maru y Andre que me acompañaron y ayudaron mucho durante estos años. A Mar Olhasso y Pe Rosende, mis compañeras de la vida. A Flor Barbé, Lai Habichayn y Nacho Zeytuntsian, por estar siempre aunque estemos lejos.

A mis compañeros de cátedras –Histo y Artro- en la Facultad de Ciencias Naturales, que me bancaron cada vez que lo necesité, especialmente a mis amigos Pana Díaz, Carla Cazorla, Mati Giglio y Coqui Villalobos.

A mis compañeros y amigos del Terrero que siempre estuvieron dispuestos a extender una mano y supieron crear fuertes lazos, Vale Spinelli, Mati Cammarata, Pato Currenti, Anita Vera y Gabi Irrazabal.

A todos los productores que contribuyeron con este proyecto desinteresadamente y sin quienes no se hubiese podido realizar, por su calidad humana y su gran predisposición, incluso para recibirme en sus apiarios y sus casas. A la Unidad de Coordinación Apícola de la Provincia de Buenos Aires y a Raúl Pérez por su contribución.

A Nicolás Rouillet por proveerme la materia prima para los análisis de toxicidad de agroquímicos, y a Nicolás Champonnois por su predisposición y por ser el autor de algunas de las imágenes que ilustran este trabajo.

A los jurados, por sus aportes y el tiempo dispensado para la mejora de la presentación de este trabajo. Y a quienes aceptaron la proposición como jurados, pero no fueron convocados, por su predisposición.

A todos los que no nombro, pero que me acompañaron a lo largo de estos años.

Han sido invaluable para mi, GRACIAS INFINITAS.