



**TRABAJO FINAL DE CARRERA**

**ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE ABEJA MELIFERA A LA  
ADMINISTRACION ORAL DE FITOQUÍMICOS PARA EL CONTROL POTENCIAL  
DE NOSEMOSIS**

**MODALIDAD: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**NOMBRE Y APELLIDO: LAGOS, LEANDRO GASTÓN**

**N° LEGAJO: 26.535/8**

**DNI N°: 35.270.055**

**E-MAIL: LEANDROGASTONLAGOS@GMAIL.COM**

**DIRECTORA: DRA. ALBO GRACIELA NOEMÍ**

**CO-DIRECTORA: ING. AGR. VEGA MARICEL**

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1. Caracterización de la actividad apícola</b> .....	<b>7</b>
3.1.1. Nivel mundial .....	7
3.1.2. Importancia a nivel nacional .....	8
3.1.3. Importancia a nivel regional .....	9
<b>3.2. Enfermedad en estudio: NOSEMOSIS</b> .....	<b>9</b>
3.2.1. Etiología .....	9
3.2.2. Clasificación taxonómica .....	9
3.2.3. Epidemiología .....	10
3.2.4. Etiología .....	11
3.2.5. Ciclo de la infección .....	12
3.2.6. Patogenia .....	13
3.2.7. Tratamientos y alternativas de control .....	17
<b>3.3. Aceites esenciales y sus efectos antimicrobianos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.6. HIPOTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1. Determinación del grado de infección de <i>Nosema</i> spp de las colonias de <i>Apis mellifera</i></b> .....	<b>20</b>
<b>4.2. Supervivencia de la abeja melífera adulto con las distintas concentraciones de AE de salvia morada y ajedrea</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3. Dispositivo de inoculación individual de abejas con esporas de <i>Nosema</i> spp.</b>	<b>24</b>

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
<b>6. DISCUSION .....</b>	<b>27</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>29</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>30</b>
<b>9. INDICE DE TABLAS, FIGURAS E IMÁGENES .....</b>	<b>41</b>
<b>9.1. Tablas.....</b>	<b>41</b>
<b>9.2. Figuras .....</b>	<b>47</b>
<b>9.3. Fotografías .....</b>	<b>57</b>
<b>10. ACTIVIDADES OPTATIVAS REALIZADAS VINCULADAS AL TRABAJO FINAL 60</b>	

## 1. RESUMEN

Se evaluó la supervivencia in vitro de *Apis mellifera* L. adulta por la administración oral prolongada con los aceites esenciales de *Satureia hortensis* L. y *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. para el control de *Nosema* spp. Se alojaron abejas de 3 días, nacidas en condiciones controladas (35°C - 60% HR), en frascos plásticos de 500 cm<sup>3</sup>. Los tratamientos se administraron *ad libitum* durante 15 días en dos alimentadores tipo Ependorff/frasco, perforados en la base y colocados en posición horizontal. Se evaluaron dosis de 500 - 4.000 µL/L de los aceites esenciales, diluidos en alcohol 70° 2,5 %. Se efectuaron 4 repeticiones/tratamiento y como Testigo se empleó la solución de sacarosa al 50 % p/v. Se registró el número de abejas vivas y el consumo/frasco/día. Se empleó Statistical e INFOSTAT. El Test de Krüskal Wallis expuso diferencias altamente significativas en la supervivencia de abejas (%) en interacción AE\*Dosis (H = 46,18; p < 0,0001) y AE\*Fecha (H= 593,69; p < 0.0001). El Test posterior de Comparaciones Múltiples mostró que los AE *S. hortensis* a 2000, 4.000 y *L. junelliana* 4.000 µL/L resultaron los más tóxicos y que *S. hortensis* y *L. junelliana* se diferenciaron del testigo al 6° y 9° día, respectivamente. Asimismo, Krüskal Wallis expuso diferencias altamente significativas en el consumo solución + AE (µL) en interacción AE\*Dosis (H= 64,86; p < 0.0001) y AE\*Fecha (H= 215,10; p < 0.0001): El Test de Medianas mostró que el AE *S. hortensis* 4000 µL/L fue el menos consumido y se diferenció de los otros tratamientos. En la interacción AE\*Fecha, las diferencias estadísticas entre los AE y el testigo se dieron a partir del 10° día del ensayo. Los AE de *S. hortensis* 500 µL/L y *L. junelliana* 1.000 µL/L resultan una potencial alternativa para el control de *Nosema* spp, sin efectos nocivos aplicados durante 10 días.

## 2. ABSTRACT

*In vitro* survival of *Apis mellifera* L. adult was evaluated by prolonged oral administration with the essential oils (EO) of *Satureia hortensis* and *Lippia junelliana* for the control of *Nosema* spp. 3-day-old bees, born under controlled conditions (35°C - 60% RH), were housed in 500 cm<sup>3</sup> plastic contained. Treatments were administered *ad libitum* for 15 days in two Ependorff-type feeders/contained, perforated at the base and placed in a horizontal position. Doses of 500 - 4,000 µL/L of EO, diluted in 70° 2.5% alcohol and 4 repetitions/treatment were evaluated. The 50% w/v sucrose solution was used as Control. The number of live bees and the consumption/container/day were recorded. Statistical and INFOSTAT were used. The Krüskal Wallis Test showed highly significant differences in the survival of bees (%) in interaction EO\*Dose (H = 46.18; p < 0.0001) and EO\*Date (H = 593.69; p < 0.0001). The subsequent Multiple Comparison Test showed that *S. hortensis* at 2000, 4,000 and *L. junelliana* 4,000 µL/L were the most toxic and that *S. hortensis* and *L. junelliana* differed from the control on the 6<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> day, respectively. Likewise, Krüskal Wallis exposed highly significant differences in the consumption solution + EO (µL) in interaction EO\*Dose (H = 64.86; p < 0.0001) and AE\*Date (H = 215.10; p < 0.0001): The Median Test showed that EO *S. hortensis* 4000 µL/L was the least consumed and differed from the treatments. In the EO\*Date interaction, the statistical differences between the EO and the control occurred from the 10<sup>th</sup> day of the test. The EOs of *S. hortensis* 500 µL/L and *L. junelliana* 1,000 µL/L are a potential alternative for the control of *Nosema* spp, without harmful effects applied for 10 days.

### 3. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, los insectos polinizadores están ligados al bienestar humano por el mantenimiento de la salud y la función del ecosistema que nos rodea, teniendo protagonismo en la reproducción de plantas silvestres, la producción de cultivos y la seguridad alimentaria. Dentro de este conjunto, la abeja melífera (*Apis mellifera*., L.) constituye el grupo más importante de polinizadores manejados por el hombre, ya que visitan más del 90% de los 107 cultivos globales básicos que garantizan la seguridad alimentaria en el mundo (Potts et al., 2016).

Este insecto social, perteneciente al orden Himenóptera, de distribución cosmopolita, tiene una gran importancia en la generación de productos y subproductos utilizados por la humanidad a nivel global, tanto en la industria de la alimentación, como farmacéutica y otras. La Argentina se destaca por la producción de mieles de alta calidad, muy valorada en el mercado internacional, por su geografía de amplias praderas.

Existe una preocupación creciente sobre el estado actual y de conservación futuro de la abeja. Durante la última década, la salud de los polinizadores ha atraído un aumento de atención tras la constatación de que muertes de colonias de abejas son cada vez más frecuentes en algunas áreas (Maggi et al., 2016), debido a la pérdida de hábitat y fragmentación, dieta sub-óptima, enfermedades y efectos perjudiciales de exposición crónica y sub-letal a pesticidas (Goulson et al., 2018).

Una de las estrategias alternativas utilizadas en el control de patógenos de la abeja lo constituye el empleo de aceites esenciales, que han sido ensayados en el control de enfermedades bacterianas, fúngicas, virales y parasitarias en *A. mellifera*.

## 3.1. Caracterización de la actividad apícola

### 3.1.1. Nivel mundial

Dentro de la apicultura, el producto más relevante en la comercialización a nivel mundial es la miel, oscilando los 3.730.082 toneladas (tn)/año. En este marco el principal continente productor es Asia con el 46,9 %, seguido por Europa con el 22,3 %, América con 18.5 %, África con 10.7 % y Oceanía con el 1,6 % (FAOSTAT, 2018) (Figura 2.1, Aquí ). A nivel país, el principal productor es China con una producción de 989.900 tn, seguido por Turquía con 228.584 tn y Argentina con 155.847 tn (FAOSTAT, 2018).(Figura 2.2, Aquí ) Datos recientes de la campaña 2019-2020, posicionan a Argentina en el 3° lugar como productor mundial, aunque en 1° lugar se ubica China y en 2° Estados Unidos (Com.pers., 2020).

En relación a las exportaciones, China es el principal exportador de miel, seguido por Argentina que ocupa el segundo lugar. Con respecto al volumen 10 años atrás Argentina cambiaba de posiciones entre el primer y segundo lugar, pero a partir del año 2008, China consolidó su tendencia creciente que hace sostenible su liderazgo hasta la actualidad. México, India, Vietnam y Ucrania, son actores relativamente nuevos en el negocio. Se destacan China, Argentina, Alemania y Nueva Zelanda que exportaron más de 135 millones de USS (INTA, 2018). (Figura 2.3, Aquí).

En cuanto a la Importación de miel a nivel mundial, se observa una tendencia creciente en su evolución. El mercado internacional creció unas 317 mil tn en los últimos 17 años (2001-2017), a una tasa promedio anual de alrededor de 4%. El aumento fue más significativo en valores relativos en USD que en toneladas. El principal país importador de miel es Estados Unidos, seguido por Alemania, Reino Unido y Japón (Figura 2.4, Aquí ). En los últimos 5 años, Estados Unidos ha adquirido

anualmente alrededor del 27% de la miel comercializada en los mercados mundiales. Es importante destacar que destina la miel principalmente a la industria. Por otro lado, Alemania ha absorbido el 13% promedio de las compras y es el principal consumidor de miel per cápita en la Unión Europea (MINAGRI, 2017).

Por último, en una estimación del consumo aparente per cápita de miel promedio de los últimos años (2012-2016) para los principales países, se observa que Turquía y Alemania superan el kilo promedio de miel por habitante/año (INTA, 2018). Por otro lado, los principales exportadores (China, Argentina, México e India) tienen bajo consumo interno y exportan casi toda su producción encontrándose los consumos en el rango de 50 y 250 gramos habitante/año (INTA, 2018) (Figura 2.5, Aquí).

---

### ***3.1.2. Importancia a nivel nacional***

En los últimos 50 años la producción argentina tuvo un crecimiento del 282% pasando de 20.000 ton en 1961 a 76.379 ton en 2017 (MINAGRI, 2017) (Figura 2.6, Aquí ). Para 2017 alcanzó el número de 11.671 productores registrados en Registro Nacional de Productores Apícolas (RENAPA) con un total de 36.377 apiarios y más de 2,9 millones de colmenas. Se considera que genera 60.000 puestos de trabajo que se duplican al momento de la cosecha de miel. En particular, la Argentina presenta un consumo de 156 gramos/habitante/ año (INTA, 2018).

La miel argentina es muy valorada en el contexto internacional por su reconocida calidad; entre el 90 y el 95% de la producción se exporta a granel, con un volumen que para 2017 alcanzó las 76.379 tn (MINAGRI, 2017). En 2018, las exportaciones de miel alcanzaron un total de 67.000 tn, (MINAGRI 2018).

Los principales destinos de las exportaciones de Argentina son Estados Unidos y Alemania. Donde se observa que Estados Unidos aglutina alrededor del 50% tanto en cantidad como en valor (Tabla 1.1, Aquí ).



---

### 3.1.3. *Importancia a nivel regional*

Las colmenas se ubican principalmente en las provincias que conforman la región de la Pampa Húmeda. Casi el 50% del total de colmenas están en la provincia de Buenos Aires. Otro 35% se reparte entre las provincias de Córdoba, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos. El 15% restante se distribuye en el resto del territorio nacional (SENASA 2014). Con excepción de Tierra del Fuego, todas las provincias argentinas explotan colmenas comercialmente.

## 3.2. Enfermedad en estudio: NOSEMOSIS

---

### 3.2.1. *Etiología*

Pese a la fuerte intervención del hombre en el agro-ecosistema, las abejas se ven amenazadas por una gran cantidad de patógenos y parásitos, que forman parte de la denominada patosfera (Evans & Schwarsz, 2011), que las afecta y genera una red adicional que las desafía en todo momento. Esta patosfera incluye virus; bacterias; protozoos; metazoos y hongos (Schwarz et al., 2015). Más aún, en estos últimos 15 años, ha existido un continuo incremento de pérdidas y despoblación de colonias, denominado pérdida de colmenas (Maggi et al., 2016). Este nuevo paradigma es fundamental para entender la salud de las abejas.

---

### 3.2.2. *Clasificación taxonómica*

Dentro de los hongos microsporidios, se han descrito dos especies del género *Nosema* que parasitan a las abejas melíferas, denominadas *Nosema apis* y *Nosema ceranae* causantes de la enfermedad denominada Nosemosis.

*N. apis* (Zander, 1909) parasita principalmente a la abeja europea (*Apis mellifera*), mientras que *N. ceranae* (Fries et al., 1996) se describió inicialmente en la abeja asiática (*Apis cerana*), aunque ambos organismos pueden parasitar cualquiera de las

dos especies de abejas (Martín-Hernández et al., 2009; Paxton et al., 2007; Botías et al., 2013; Charbonneau et al., 2016). Ambas especies de microsporidios producen una enfermedad que afecta a la viabilidad de las colmenas conocida como Nosemosis.

Gracias a las pruebas moleculares, se ha podido incluir a los microsporidios en el grupo de los hongos (Adl et al., 2005); así, taxonómicamente, dentro del taxón Microsporidia y pertenecientes al súper grupo Opisthokonta se encuentran las especies del género *Nosema* (Adl et al., 2005). Son hongos unicelulares y parásitos intracelulares obligados muy especializados que invaden las células epiteliales del ventrículo (estómago) de la abeja melífera (Bailey, 1955). Posteriormente, se descubrió *N. ceranae* en *A. mellifera* en el 2005, de manera simultánea en España (Higes et al., 2006) y Taiwán (Huang et al., 2005) y a partir de ahí ha sido considerada una pandemia.

En 2009, el grupo Coloss, compuesto por investigadores de todo el mundo, decidió adaptar la terminología que hasta entonces se había estado usando para la Nosemosis. De manera que se denominó Nosemosis A la originada por *N. apis* y Nosemosis C la originada por *N. ceranae* (Coloss, 2009).

---

### 3.2.3. *Epidemiología*

Los dos agentes causantes de la Nosemosis en abejas son morfológica y funcionalmente similares, pero causan diferentes cuadros clínicos. Desde el descubrimiento de *N. ceranae* en *A. mellifera* se ha considerado que la Nosemosis es una pandemia a nivel mundial. *N. ceranae* es la causante de la Nosemosis C, tiene una elevada prevalencia en todo el planeta (Emsen et al., 2016) y se ha demostrado su efecto letal sobre las colonias de abejas (Higes et al., 2009). Por otra parte *N. apis* es causante de la Nosemosis A, con cuadros clínicos poco recurrentes, muy localizados y en condiciones muy específicas. Se considera que a pesar de ser una de

las enfermedades más conocidas y extendidas de las abejas (Higes et al., 2011), se mantiene en equilibrio con su hospedador no llegando a eliminar a la colonia en condiciones normales y sanitariamente controladas.

El hecho de que *N. ceranae* se describiese en la abeja europea hace tan solo una década, y su relación con el Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (SDC) (Higes et al., 2009, Gómez-Moracho et al., 2015), hace pensar que su rápida invasión y extensión originó una epidemia de consecuencias catastróficas a principios del siglo veintiuno. Se ha generado cierta controversia en relación al posible desplazamiento de *N. apis* por *N. ceranae* (Martín-Hernández et al., 2012), ya que el incremento de la prevalencia de *N. ceranae* y la baja prevalencia de *N. apis*, en esta última década, sugerían esta hipótesis (Klee et al., 2007; Traver & Fell, 2011).

Los microsporidios son hongos parasitarios muy especializados. Su distribución es cosmopolita. Su estudio tiene relevancia económica a nivel mundial debido al daño producido a los colmenares.

---

#### 3.2.4. Etiología

*Nosema apis* y *N. ceranae* producen esporas en la última fase de su ciclo y son eliminadas al medio ambiente por las heces (Gilliam & Shimanuki, 1967). Las esporas son por tanto formas de resistencia encargadas de la transmisión de la enfermedad.

Mediante la diferenciación morfológica de la espora se pueden identificar ambos microsporidios. En ambas especies las esporas son refringentes, de forma ovalada pero de diferente tamaño. Las esporas de *N. apis* (6 x 3 µm; Zander & Böttcher, 1984 citado por Fries et al., 2013) son aproximadamente 1 µm más largas que las de *N. ceranae* (4,7 x 2,7µm; Fries et al., 1996), (Figura 2.7, Aquí).

Al observar estas esporas mediante microscopía electrónica, se distinguen principalmente dos membranas: La más externa (exospora), está formada por

proteínas que no permiten el paso de la luz, mientras que la capa interna (endospora) se compone de quitina y permite el paso de la luz. Ambas capas le confieren a la espora gran resistencia fuera del hospedador frente a condiciones climáticas adversas.

En la parte anterior de la espora, se distinguen dos estructuras: el disco de anclaje, donde comienza el tubo polar (más corto en *N. ceranae*, y el diplocarion (doble núcleo). El filamento o túbulo polar rodea toda la espora mediante 20 y 23 vueltas en *N. ceranae* o con más de 30 vueltas en *N. apis* (Fries et al., 1996). También se aprecia una vacuola con material flocular en la parte posterior. Se denomina esporoplasma al material que envuelve ambas partes (Figura 2.8, Aquí ).

---

### 3.2.5. *Ciclo de la infección*

La infección se produce por la ingestión de esporas con el alimento, por la trofalaxis o quizás después de la limpieza de los pelos del cuerpo (Higes et al., 2009).

Tras ser ingeridas por las abejas invaden en primer lugar el epitelio de la parte posterior del ventrículo, donde comenzarán a germinar debido al ambiente básico creado por los jugos gástricos (Bailey, 1955). El mecanismo utilizado, se basa en la eversión del filamento polar de la espora durante la germinación. El túbulo polar atraviesa la membrana de una célula epitelial del ventrículo, e inyecta en el citoplasma el esporoplasma binucleado (Larsson, 1986). A continuación, se produce la fusión de los dos núcleos, dando lugar a la fase de merogonia, donde el núcleo se dividirá asexualmente formando los merontes. En *N. apis* se han descrito dos ciclos merogónicos, siendo aún desconocido el número de ciclos de merogonia para *N. ceranae*. Los merontes se dividen para dar lugar a los esporontes sobre los que se evidencian depósitos de queratina que formarán parte de la futura exospora. Los esporontes se vuelven a dividir para formar los esporoplastos, a partir de los cuales se generan las esporas de primera generación, caracterizadas por presentar una fina

endospora. Estas esporas vuelven a germinar dentro de la misma célula o en las células adyacentes, favoreciendo la transmisión. Por el contrario, las esporas procedentes de la segunda generación (esporas medioambientales) tienen una endospora más gruesa. En el caso de *N. apis*, las esporas maduras comienzan a producirse en grandes cantidades transcurridos tres días después de la infección. Igualmente en el caso de *N. ceranae* se ha descrito que a los tres días post-infección ya se observan esporas maduras (Higes et al., 2009).

Las células parasitadas con gran cantidad de esporas acabarán rompiéndose y liberando las esporas a la luz del tubo digestivo, que serán expulsadas al exterior con las heces. Gracias a este mecanismo pueden producirse simultáneamente auto infecciones y nuevas infecciones. La presencia de esporas vacías dentro de las células epiteliales indica que el parásito completa su ciclo dentro del hospedador (Fries et al., 1996; Higes et al., 2009). En un tiempo medio de 2 semanas, la infección se habrá extendido por todo el epitelio (Figura 2.9, Aquí)

---

### 3.2.6. *Patogenia*

#### **Nosemosis A**

La Nosemosis A es la enfermedad provocada por *N. apis*. La infección por *N. apis* puede pasar desapercibida, ya que frecuentemente no muestra signos aparentes de la enfermedad, incluso cuando el nivel de infección debiera ser suficiente para afectar a la producción de miel (Fries et al., 1996). La mayor prevalencia de abejas infectadas con *N. apis* está descrita para los meses de otoño, siendo durante el invierno cuando en las colonias infectadas pueden aumentar la mortalidad o colapsar (Fries, 2013).

Se han descrito brotes agudos de la enfermedad al principio de la primavera, donde se observan manchas fecales marrones de olor ácido peculiar sobre los cuadros y en la entrada de la colmena (Bailey, 1967). En estos casos es frecuente observar un

elevado número de abejas débiles o muertas, en la entrada de la colmena o en sus proximidades, que presentan un abdomen aumentado de tamaño o encogido (Gómez, 1998). Las abejas que están delante de la piquera, intentan regresar utilizando la vegetación. Lo que indica la presencia de abejas debilitadas incapaces de volar y regresar a la colmena.

A nivel individual, *N. apis*, genera cambios en la función celular de diferentes tejidos en la abeja, que conlleva a un fallo funcional del órgano. Además, se puede observar la variación de color que provoca la infección en el ventrículo, el cual aparece de color marrón en las abejas sanas, mientras que en las abejas infectadas adquiere un color blanquecino. El tejido ventricular infectado es más frágil en su manipulación y tiene un aspecto hinchado (Bailey, 1981; Liu, 1984). La malnutrición causada por la dificultad en la digestión de nutrientes, como por ejemplo la digestión de las proteínas, provoca anemia (Gilliam & Shimanuki, 1967) y atrofia en las glándulas hipofaríngeas (Tomaszweska, 1979). Este fallo en el metabolismo celular genera una disminución en la síntesis de energía, debilidad en las abejas y dificultad en la capacidad de vuelo (Moeller, 1978). En la abeja reina se ha observado que puede atrofiar las ovarias hasta producir esterilidad. Por último se ha descrito que *N. apis* es capaz de comprometer la fertilidad en zánganos (Peng et al., 2015).

A nivel de colonia, un número elevado de abejas adultas afectadas con Nosemosis A, repercute en la pérdida de abejas durante el invierno y al inicio de la primavera. Esta mortalidad se debe, entre otras cosas, a la falta de reservas acumuladas en el cuerpo graso (Lotmar, 1939). La Nosemosis A disminuye la producción de miel y jalea real, esto se ve reflejado en un inadecuado desarrollo de las larvas y cuidado de las reinas (Wang & Moeller, 1969 citado por Alaux et al., 2010).

## **Nosemosis C**

La Nosemosis C está provocada por la infección de *N. ceranae* a las abejas. Se caracteriza por su presencia durante todo el año, y por la ausencia de signos clínicos relacionados con la infección por *N. apis* como depósitos fecales o el abdomen dilatado (Martín-Hernández et al., 2007). El daño que provoca *N. ceranae* a nivel individual está ampliamente admitido como agente infecto-contagioso (Higes et al., 2009).

El daño que *N. ceranae* provoca en las abejas a nivel individual se ha estudiado mediante infecciones experimentales realizadas en condiciones de laboratorio (Higes et al., 2009). Los resultados obtenidos muestran a través de cortes ultra finos observados por microscopía electrónica, como el parásito invade los pliegues de las células basales del epitelio ventricular. Y a los tres días post-infección observaron esporas maduras dentro de estas células, sugiriendo que el ciclo se había completado. Se ha demostrado que *N. ceranae* es capaz de bloquear parcialmente los mecanismos de defensa humoral y celular, dirigiendo el metabolismo nutricional a una mayor disponibilidad de nutrientes a favor del patógeno, disminuyendo sus defensas (Kurze et al., 2016). Durante la infección disminuye la expresión de la hormona vitelogenina (Golbrisch et al., 2013) que participa en la síntesis de jalea real (Amdam et al., 2003), promueve la inmunidad, actúa en la respuesta a estrés y longevidad de la abeja (Nelson et al., 2007); altera la producción de hormona juvenil que junto a la vitelogenina, explica la rápida maduración de las abejas y la disminución de la esperanza de vida (Goblirsh et al., 2013). En cambio, *N. apis* no presenta dicha capacidad (Antúnez et al., 2009). Además *N. ceranae* es capaz de evitar que la célula hospedadora active su mecanismo de apoptosis como última herramienta defensiva, alargando la funcionalidad de la misma para aprovechar sus recursos (Martín-Hernández et al., 2017).

En la Nosemosis C las abejas más infectadas son las pecoreadoras, muchas de las cuales en el caso de *N. ceranae*, no regresan a la colmena (Jack et al., 2016) o si lo hacen tardan más en volver y con menor cantidad de alimento (Naug et al., 2014). Esta enfermedad en las colonias se caracteriza por una fase asintomática muy prolongada previa a la muerte. En esta fase asintomática, se pueden detectar una serie de signos muy sutiles que pueden indicarnos que está afectada, como son: puesta de la reina en los meses invernales donde no suele haber cría, una mayor proporción de cría respecto a abejas obreras en los meses templados comparado con colonias no infectadas y sobre todo un descenso en la producción de miel en los dos años previos (Higes et al., 2009). El aumento de la cantidad de abejas jóvenes al inicio de la primavera diluye el porcentaje de parasitación de la enfermedad en la colonia. La mayoría de las abejas recién nacidas no están infectadas, por lo que se retrasa la posible infección de la reina. Esto tiene dos consecuencias: una aparente recuperación y un retraso en la muerte de la colonia (Higes et al., 2009).

La infección por *N. ceranae* en las abejas pecoreadoras reduce el tiempo de vuelo, como consecuencia de ello se disminuye la capacidad de regreso a la colmena, de manera que la colonia va perdiendo abejas de manera progresiva (Wolf et al., 2014). Esta pérdida de abejas adultas obliga a las abejas obreras jóvenes a madurar precozmente para realizar las tareas de pecoreo. Esto conlleva una reducción de la esperanza de vida de las abejas parasitadas (Lecocq et al., 2016), y una disminución del tiempo dedicado al cuidado de la cría principalmente, como a otras tareas de interior. Esto explica la aparición de otras enfermedades como la loque americana: (*Paenibacillus larvae*), loque europea (*Melissococcus plutonius*) o la ascosferosis (*Ascosphaera apis*), de ahí que la presencia de estas enfermedades sean común en colmenas en las que el proceso está muy avanzado (Hedtke et al., 2011).



Se ha demostrado que *N. ceranae* produce una infección más agresiva y con mayores porcentajes de mortalidad, que la enfermedad provocada por *N. apis* (Paxton et al., 2007), tanto a nivel de individuo (Eiri et al., 2015) como a nivel de colonia (Wolf et al., 2014).

---

### 3.2.7. *Tratamientos y alternativas de control*

Aunque el papel de este parásito en el trastorno de colapso de colonias de abejas y las pérdidas de colonias se debate, hay solo un antibiótico disponible para tratar la infección por *N. ceranae* y *N. apis*, utilizado durante más de 60 años el cual ha sido el biciclohexilamonio fumagilina (fumagilina), aislado del hongo *Aspergillus fumigatus* (Williams et al., 2008).

Aunque se degrada rápidamente en la colmena, los residuos de fumagilina pueden persistir en la miel y la cera hasta por seis meses (Higes et al., 2011). Estas bajas concentraciones de fumagilina pueden conducir al desarrollo de resistencias, lo que provoca una hiperproliferación de *N. ceranae*, pero no de *N. apis* (Huang et al., 2013). Hoy en día, el medicamento tiene licencia en algunos países y su uso está restringido porque aún no se ha especificado un límite seguro de residuos en la miel (Higes et al., 2011; van den Heever, 2016). Además, la fumagilina no puede administrarse a las colonias antes del flujo nectarífero, para evitar que la miel sea contaminada.

El desarrollo de resistencia a la fumagilina en *N. ceranae* y el riesgo de contaminar la miel con residuos tóxicos apuntan a la necesidad de tratamientos alternativos más seguros para la ambiente y el hombre.

En vista de esta problemática es necesario buscar alternativas en el control de *Nosema* spp. en abeja melífera.

### 3.3. Aceites esenciales y sus efectos antimicrobianos

Los aceites esenciales son compuestos naturales derivados del metabolismo secundario de las plantas. Son fitoquímicos constituidos por más de 80 componentes, de los cuales de 3 a 10 son componentes mayoritarios (Bakkali et al., 2008). Poseen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales e insecticidas (Chouhan et al., 2017). Particularmente, existen numerosos trabajos en los que se demuestra la utilidad de los aceites esenciales en el manejo de las enfermedades que afectan al ser humano (Benny, et al., 2019), animales (Ezzat Abd El-Hack et al., 2016), enfermedades de las plantas (Diáñez, et al., 2018). En el tratamiento de patologías de *A. mellifera* se ensayaron en el control *in vitro* de: *P. larvae* (Alonso-Salces et al., 2017; Tutum et al., 2018; Giménez-Martínez et al., 2019), de *A. apis* (Gabriel, et al., 2018; Nardoni et al., 2018; Tutum et al., 2018), *Varroa destructor* (Tutum et al., 2018; Bakar et al., 2019) y *Nosema* spp. (Brasesco et al., 2017; Cristina et al., 2020). Asimismo, se efectuaron ensayos *in vivo* en el control de *A. apis* (Colin et al., 1989); *P. larvae* (Albo et al., 2003); *N. ceranae* (Porrini et al., 2017)

El aceite esencial de *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. (Verbenaceae), cuyo nombre vulgar es “salvia morada”, es un arbusto aromático perenne endémico nativo, del centro de Argentina, que alcanza 1,5 m de altura y se puede encontrar en las regiones montañosas de las provincias de Córdoba, La Rioja, San Luis, Tucumán, Jujuy, Catamarca, Salta y Santiago del Estero. En tanto, el aceite esencial de *Satureia hortensis* L. (Lamiaceae) es originaria de zonas templadas y cálidas de Europa. Es denominada “ajedrea”. Ambos aceites esenciales han sido empleados en el control *in vitro* de *A. apis* (Albo et al., 2014) y *P. larvae* (Alippi et al., 1996), respectivamente (Tabla 1.2, Aquí ).

Existen muchos antecedentes científicos que demuestran la eficacia de algunos componentes principales de los aceites esenciales en el control de patologías de la abeja. Hay evidencia científica sobre el carvacrol (uno de los componentes de *S. hortensis*) (Tutun et al., 2018).

### 3.4. OBJETIVO GENERAL

Evaluación del efecto *in vitro* de los aceites esenciales de *L. junelliana* y *S. hortensis*, potenciales agentes de control de la Nosemosis, sobre la supervivencia de *Apis mellifera*, L, bajo un régimen de administración *ad-libitum* oral prolongado.

### 3.5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la supervivencia de la abeja melífera adulta (*A. mellifera*, L) con distintas concentraciones de los aceites esenciales de *L. junelliana* y *S. hortensis* por un régimen de administración oral prolongada.
- Determinar la mayor concentración tolerada por la abeja adulta de los AE en estudio.
- Desarrollar y optimizar la técnica utilizada para la inoculación de la abeja melífera con esporas de *N. ceranae*.

### 3.6. HIPOTESIS

El uso de los aceites esenciales de *L. junelliana* y *S. hortensis*, como potencial agente de control de la Nosemosis, tiene efectos sobre la supervivencia de la abeja melífera adulta administrados *ad-libitum* por un régimen de alimentación oral prolongada.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este TFC tuvo como objetivo obtener la concentración más segura para administrar sustancias volátiles bajo un régimen oral prolongado. Los tratamientos evaluados incluyeron los aceites esenciales (AE) de *L. junelliana* (Mold.) Tronc. (Verbenaceae) “ajedrea” y *S. hortensis*, L. (Flia. Lamiaceae). El AE de *L. junelliana* fue provisto por INTA Castelar y *S. hortensis* por la Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Los ensayos fueron conducidos en el laboratorio del Curso Producción Animal I, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata.

### 4.1. Determinación del grado de infección de *Nosema* spp de las colonias de *Apis mellifera*

El nivel de infección de las colonias con *Nosema* spp. se puede medir a través del conteo del número promedio de esporas, ya que existe una buena correlación entre la proporción de abejas infectadas y el número promedio de esporas en una muestra agrupada de abejas (Fries et al., 1988).

Para el diagnóstico y detección de colonias infectadas con *Nosema* spp. Se seleccionaron 6 colmenas al azar del apiario Experimental de la FCAYF (Fotografía 3.1, Aquí), de las que se tomó una muestra individual (por colonia) de 60 abejas pecoreadoras, ya que éstas son infectadas con mayor frecuencia en comparación con las abejas más jóvenes (Meana et al., 2010; Smart y Sheppard, 2012). Las mismas fueron recolectadas en la entrada de la colmena (piquera) teniendo precaución de no recoger abejas jóvenes que realizan sus vuelos de orientación. Para su conservación se colocaron en un frasco de vidrio, con alcohol 96% ya que las muestras fueron procesadas en el día.

Para el procesamiento de cada muestra se siguió la siguiente secuencia (Fotografía 3.2 Aquí):

- ✚ 3 lavados de la muestra con agua corriente, para eliminar los restos del conservante (alcohol).
- ✚ Escisión de los abdómenes de las 60 abejas del resto del cuerpo.
- ✚ Preparación de un macerado: triturando los abdómenes en un mortero con punzón, en el que se incorporó inicialmente 10 ml. de agua destilada.
- ✚ Filtrado de partes gruesas con un embudo y gasa.
- ✚ Se enjuagó con 20 ml de agua destilada.
- ✚ Se realizó una segunda filtración utilizando filtro de malla, con tamaño 0.044 mm.
- ✚ Se enjuagó con 30 ml de agua destilada.
- ✚ Con el macerado obtenido, se realizó la observación de las muestras sobre un portaobjeto común determinando cualitativamente el contenido de esporas: muestras con baja o nula concentración de esporas y muestras con alto contenido de esporas (muestras positivas). (Fotografía 3.3, Aquí)
- ✚ Con estas últimas, se procedió a la determinación cuantitativa realizando el conteo de esporas con un hemocitometro de 4x4 (cámara de Neubauer) (Cantwell,1970) .
- ✚ Se tomó una alícuota con pipeta Pasteur y se depositó en la muesca una alícuota suficiente como para cargar la cámara (aprox. 10 µl). Se corroboró el llenado de la misma, evitando que desborde. Se dejó reposar aproximadamente de 1 a 3 minutos, y se colocó un cubreobjetos de vidrio. En

el espacio entre ambos (cámara y cubreobjeto) queda un volumen de muestra determinado, el cual se observó con un microscopio óptico con aumento 40x.

- ✚ Las muestras que contenían más de 50 esporas por cuadrado (delimitado por doble línea), se diluyeron 10 veces, hasta que se obtuvieron valores en este rango. Esto determinó el factor de dilución.
- ✚ Las muestras diluidas fueron homogeneizadas utilizando un agitador Vortex durante el proceso, para garantizar una suspensión uniforme de las partículas.
- ✚ El número de esporas contadas en este volumen se utilizó para extrapolar el número de células de la muestra total. Se contabilizaron sólo aquellas esporas que estaban enteramente dentro de un sector delimitado de la cámara (cuadrado demarcado por doble línea), y en caso de posicionarse justo sobre la doble línea divisoria, sólo aquellas que atravesaban los límites superior e izquierdo.
- ✚ Se calculó el número de esporas por ml de la muestra original a partir del volumen conocido de la cámara de recuento. La fórmula utilizada fue:

**Fórmula:  $\frac{\text{Número total de esporas contabilizadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{Área del cuadrado en (mm}^2\text{)} \times \text{profundidad de la cámara}} = \text{Esporas/ml}$**

**Área del cuadrado en (mm<sup>2</sup>) x profundidad de la cámara**

Los resultados obtenidos fueron registrados en planillas para sistematizar la información de las colmenas sin presencia de *Nosema* spp. que serían utilizadas en el ensayo de supervivencia.

## **4.2. Supervivencia de la abeja melífera adulto con las distintas concentraciones de AE de salvia morada y ajedrea**

La metodología empleada se basó en los criterios propuestos en el manual de métodos estandarizados para estudios de toxicidad sistémica prolongada “Beecoloss” (Porrini et al., 2013; Porrini et al., 2017), con modificaciones.

El primer paso fue la obtención de abejas adultas sanas. Para ello se seleccionó una colmena del apiario experimental del Curso de Producción Animal I, FCA y F, UNLP, que mostró un nivel de infección por Nosemosis inexistente, en la que se colocó un canasto técnico con un cuadro sin cría, por un término de 3 o 4 días, para de esta manera obtener abejas nacidas dentro de un rango acotado de tiempo. Luego se procedió a retirar el canasto técnico (cuando ya todas las celdas del cuadro presentaban postura) se dejó el cuadro de cría en la colmena hasta el día 19, luego se extrajo el panal de cría operculado – cuando se observaron pupas en estadio 8- y se mantuvo en incubadora hasta la emergencia de los imagos, en condiciones controladas de temperatura y humedad (32°C; 60% HR). Las abejas emergentes estuvieron alimentadas con jarabe de sacarosa y un polivitamínico comercial (según las especificaciones del fabricante), durante los primeros dos días. Luego fueron cuidadosamente manipuladas y confinadas al azar en contenedores plásticos, con restricción de alimento para generar sensación de inanición durante dos horas (120 minutos).

En un ensayo preliminar, se optimizó el diseño de distintos contenedores para confinar las abejas adultas. El sistema seleccionado fueron frascos cilíndricos plásticos de 500 gramos (g), acondicionados con orificios en las paredes laterales para garantizar la ventilación interna.

Para la administración de los tratamientos se utilizaron alimentadores tipo Ependorff perforados en la base y colocados en posición horizontal en cada frasco. Las unidades de ensayo se pueden observar en la foto siguiente (Fotografía 3.4, Aquí).

Los AE se utilizaron en dosis de 500, 1.000, 2.000 y 4.000  $\mu\text{L/L}$ , diluidos en 2,5% alcohol 70° (diluyente) e incorporados a una solución sacarosa en agua destilada estéril 50% p/v. Se emplearon cuatro repeticiones por tratamiento. Como testigo se utilizó una solución de sacarosa 50% p/v + 2,5% alcohol 70°. La administración de los tratamientos fue *ad libitum* y el recambio de alimentadores se hizo en forma diaria, para evitar la cristalización del alimento.

En planillas de registro se relevó la supervivencia (Abejas vivas/día) y el consumo del lote (gramos) durante 15 días y diariamente se retiraron las abejas muertas de cada frasco para evitar contaminaciones. La información se volcó en tablas Excel. Se efectuó la conversión del consumo de la solución + AE en gramos a microlitros, teniendo en cuenta el valor de la densidad de los AE. Los resultados se procesaron con STATISTICAL e INFOSTAT.

#### **4.3. Dispositivo de inoculación individual de abejas con esporas de *Nosema* spp.**

Se desarrolló la optimización de un sistema de alimentación individual, ya que este tipo de alimentación produce una variación significativamente menor en el nivel de respuesta a la infección en comparación con la alimentación grupal (Furgala y Maunder, 1961) y es recomendada para los experimentos de laboratorio de evaluación de la actividad antiparasitaria de los AE en abeja melífera. La inoculación individual se realiza para asegurar que las abejas estén expuestas a una cantidad conocida de esporas (Higes et al., 2009; Maistrello et al., 2008).



Se diseñaron diferentes sistemas de placas, con tubos cilíndricos plásticos de 2,5 cm de alto y 16 mm de diámetro con tapa, por esta última se hizo traspasar un tips de micropipeta con un corte a bisel (Fotografía 3.5, Aquí). El corte en la punta permite generar una gota colgante desde donde las abejas se pudieran proveer del jarabe con inóculo.

Se realizó la prueba del dispositivo de inoculación individual, obteniendo abejas sanas de la misma manera que para los ensayos de supervivencia. Se utilizaron abejas de 3 días de edad que fueron sometidas a dos horas de inanición, para garantizar que todo el inóculo se ingiriera rápidamente (Higes et al., 2009; Maistrello et al., 2008), en un tiempo no mayor a tres, horas en los frascos de confinamiento.

Luego, se procedió a anestésiar a las abejas inyectando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por un tiempo no mayor a 5 segundos, para facilitar la introducción de cada una de las abejas en el tubo correspondiente.

Se preparó el jarabe de inoculación con esporas de *Nosema* spp. frescas, debido a que si estas se encuentran congeladas pierden la viabilidad, obtenidas de las colmenas con presencia del hongo confirmada y cuantificada previamente. El volumen de solución administrado por abeja fue de 10 µl de jarabe de sacarosa 50% (peso/volumen) que contenía  $2,32 \times 10^4$  esporas frescas de *Nosema* sp y 1g/litro de polivitamínico comercial. Simultáneamente se controló el tiempo de alimentación. (Fotografía 3.6, Aquí)

La dilución de la suspensión de esporas purificada a la concentración deseada se realizó usando la fórmula:

$$C1.V1 = C2.V2$$

Dónde:

C1 = concentración inicial;

V1 = volumen inicial;

C2 = concentración final;

V2 = volumen final

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de supervivencia se seleccionaron las concentraciones más altas de los tratamientos evaluados, que no causaron efectos deletéreos en la abeja adulta, con el objetivo de probar en futuras investigaciones la actividad antiparasitaria sobre *Nosema* spp. durante un ensayo más prolongado.

## 5. RESULTADOS

El Test de Krüskal Wallis presentó diferencias altamente significativas en la supervivencia de abejas (%) en la interacción AE\*Dosis ( $H = 46,18$ ;  $p < 0,0001$ ). El Test posterior de medianas por Comparaciones Múltiples mostro que el AE de *S. hortensis* a 4.000  $\mu\text{L/L}$  resultó ser el más toxico, aunque no se diferenció de la dosis de 2000  $\mu\text{L/L}$  y de *L. juneliana* a 4.000  $\mu\text{L/L}$ . Por otra parte, *S. hortensis* y *L. juneliana* en las dosis 500 y 1000  $\mu\text{L/L}$ , y 500, 1000 y 2000  $\mu\text{L/L}$ , respectivamente, presentaron la menor toxicidad y no se diferenciaron de los testigos (Tabla 1.3, Aquí; Figura 2.10, Aquí).

El efecto de la interacción AE\*Fecha sobre la supervivencia de las abejas expuesto por Krüskal Wallis reveló diferencias altamente significativas ( $H= 593,69$ ;  $p < 0.0001$ ) (Tabla 1.4, Aquí ; Figura 2.11, Aquí ) .Por otra parte el Test de medianas presenta el mismo comportamiento de los AE y el testigo durante los primeros 5 días del experimento, a partir del 6<sup>a</sup> día el AE de *S. hortensis* se separa del testigo en el

momento que presenta una supervivencia del 73 %. En tanto el AE de *L. juneliana* se separa del testigo al 9<sup>a</sup> día con una supervivencia del 60 %. Al final del experimento (día 15) se observó una supervivencia de 17 y 20 % en *S. hortensis* y *L. juneliana*, respectivamente.

El consumo de la solución de sacarosa + AE ( $\mu\text{L}$ ) de la interacción AE\*Dosis expuso diferencias altamente significativas con Kruskal Wallis ( $H= 64,86$ ;  $p < 0.0001$ ). El Test de medianas por Comparaciones Múltiples mostro diferencias entre el testigo y ambos AE a 2000  $\mu\text{L/L}$ . A la concentración de 4000  $\mu\text{L/L}$  solo el AE de *S. hortensis* muestra un descenso en el consumo que llega a 0,032  $\mu\text{L}$ , diferenciándose de los otros 2 tratamientos. (Tabla 1.4, Aquí ; Figura 2.12, Aquí ).

Con respecto a la interacción AE\*Fecha sobre el consumo de la solución de sacarosa + AE ( $\mu\text{L}$ ), el Test de Kruskal Wallis manifestó diferencias altamente significativas ( $H= 215,10$ ;  $p < 0.0001$ ). Se observa con el Test posterior de medianas que a partir de 3<sup>o</sup> día disminuye el consumo de AE de *S. hortensis*, aunque las diferencias estadísticas entre los AE y el testigo se dan a partir del 10<sup>o</sup> día del ensayo (Tabla 1.5, Aquí , Figura 2.13, Aquí ).

## 6. DISCUSION

Hasta ahora, ha habido relativamente pocos intentos de utilizar nutraceuticos o fitoquímicos para controlar *N. ceranae* y *N. apis* en abejas melíferas. Se probó que alimentar a las abejas con extractos de tomillo y ajedrea que contienen compuestos antimicrobianos, timol y carvacrol (ambos también se encuentran en el aceite de orégano), en almíbar de azúcar, no redujo las cargas de esporas de *Nosema* spp. en el campo, aunque produjo alta mortalidad de las abejas (Maistrello et al., 2008). Sin

embargo, muchos otros estudios que alimentaron a las abejas con timol o el compuesto antiinflamatorio, resveratrol, encontraron una reducción en las cargas de esporas de *N. ceranae* como *N. apis* en abejas infectadas, y el resveratrol también disminuyó la mortalidad de las abejas (Costa et al., 2010; van den Heever et al., 2016).

En un estudio reciente se administraron nutraceúticos y antimicrobianos derivados de vegetales para reducir el conteo de esporas de *N. ceranae* y se evaluó la mortalidad de abejas. Se enjaularon e inocularon con abejas con esporas de *N. ceranae* y los tratamientos se administraron en jarabe de azúcar. Dentro de los compuestos más efectivos estuvieron el carvacrol del aceite de orégano, con una reducción máxima en el conteo de esporas fue del 57% con una concentración intermedia y la mortalidad máxima de las abejas fue del 23% con la concentración más alta (Borges et al., 2020).

En otro estudio, Porrini et al., (2017) evaluaron los efectos *in vivo* de diferentes aceites esenciales y componentes principales sobre la supervivencia de abejas y el desarrollo de *N. ceranae* bajo un régimen oral *ad libitum* prolongado. Las sustancias administradas en el jarabe de sacarosa a las abejas recién emergidas a diferentes concentraciones se consumieron con avidez y causaron diferentes resultados de supervivencia. No obstante, las dosis sub-letales de sustancias no controlaron el parásito. En particular, los autores demostraron una supervivencia de 9,5 y 12, 5 días de promedio (mg/kg), con la administración del AE de orégano y el componente principal carvacrol, respectivamente. Por otro lado, en el presente experimento, el AE de *S. hortensis*, cuyos componentes mayoritarios fue 35% de carvacrol (monoterpeno fenólico) y 40,5% gama terpineno (carburo monocíclico) tuvieron una supervivencia de 43 % y 17% a los 9 y 15 días de aplicación de los tratamientos, respectivamente, frente el AE de *L. junelliana*, cuyos componentes mayoritarios fueron monoterpenos cetónicos (17-20% cis-davanona; 11-14,8% mircenona; 7-8,3% Z-ocimenona) y un monoterpeno carburo acíclico (9% mirceno), que expuso una supervivencia de 46% y

20% a los 11 y 15 días, respectivamente. El control presentó una supervivencia de 42 y 39% al 14° y 15° día del ensayo.

Con respecto al consumo, Porrini et al., (2017) observaron diferencias significativas con cianamaldehído entre las dos concentraciones evaluadas. El consumo del AE de orégano y carvacrol fue de  $0.019 \pm 0.007$  y  $0,0023 \pm 0,004$ , respectivamente. En el actual experimento, los AE de *S. hortensis* y *L. junelliana*, con carvacrol y cis-davanona como componentes principales, respectivamente, tuvieron diferencias en el consumo de los tratamientos; con el testigo a 2000  $\mu\text{L/L}$ , pero el AE *S. hortensis* a 4000  $\mu\text{L/L}$  fue el más tóxico con un consumo de 0,032  $\mu\text{L}$  de solución sacarosa + AE/abeja.

## 7. CONCLUSIONES

Este estudio determinó la supervivencia de la abeja melífera adulta (*A. mellifera*., L) con distintas concentraciones de los aceites esenciales de *L. junelliana* y *S. hortensis* y el consumo de la mayor concentración tolerada solución de sacarosa + aceites esenciales en estudio, como potenciales fitoquímicos en el control in vitro de *Nosema* spp.

Los AE de *S. hortensis* 500  $\mu\text{L/L}$  y *L. junelliana* 1.000  $\mu\text{L/L}$  podrían resultar una potencial alternativa para el control de *Nosema* spp, sin efectos nocivos aplicados durante 10 días, aunque se requiere complementar con estudios de supervivencia sobre los estadios ontogénicos y de eficacia a campo en colonias de abejas melíferas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- **Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, ... & T. Y. James.** 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryotic*, 52(5), 399-451.
- **Adriana M. Alippi, Jorge A. Ringuelet, Elsa L. Cerimele, María S. Re & Cynthia P. Henning.** 1996. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Against *Paenibacillus* larvae, the Causal Agent of American Foulbrood Disease, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 4:2, 9-16, DOI: 10.1300/J044v04n02\_03
- **Alaux C, Dantec C, Parrinello H, Le Conte Y** Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*. 2011; 12:496.
- **Albo, G., F. Reynaldi, H. Elder, M.A., Juárez, S. Córdoba.** 2014. Control *in vitro* de *Ascosphaera apis* con *Schinus molle* y *Lippia junelliana*. Efectos tóxicos potenciales en abeja melífera. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura FILAPI 2014. Misiones, Argentina. 3 – 6 septiembre 2014.
- **Albo, G.N., C. Henning, J. Ringuelet, F.J. Reynaldi, M.R. De Giusti & A.M. Alippi.** 2003. Evaluation of some essential oils for the control of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 34: 417-437. DOI: 10.1051/apido:2 003040

- **Alonso-Salces, R.M., N.M. Cugnata, E. Guaspari, M.C. Pellegrini, I. Aubone, F.G. De Piano & S.R. Fuselli.** 2017. Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. *Apidologie*.2017; 48(3): 387-400.
- **Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W..** 2003. Social Exploitation of Vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100:1799-802
- **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(9), 2284-90.
- **Bailey, L.** 1955. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. *Ann Appl Biol*. 43(3), 379-389.
- **Bakar, M. A., M. A. Aqueel, A. B. M. Raza, R. Mahmood, Qadir, Z. A. M. Arshad, & M. Sohail.** 2019. Evaluation of essential oils for the management of parasitic bee mites, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) *in vitro*. *Pakistan J Agric Res*.32(4), 566
- **Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, Mldamar.** 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 446-75.
- **Benny, A., & J. Thomas.** 2019. Essential Oils as Treatment Strategy for Alzheimer ' s Disease: Current and Future Perspectives Authors.
- **Borges, D., E. Guzman-Novoa, P.H. Goodwin.** 2020. Control of the microsporidian parasite *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) using nutraceutical and immuno-stimulatory compounds *Plos One*. Published: January 10, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227484>

- **Botías, C., R. Martín-Hernández, A. Meana, & M. Higes.** Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Res Vet Sci.* 2013; 95: 1041-5.
- **Brasceso, C., L. Gende, P. Negri, N. Szawarski, A. Iglesias, M. Eguaras,... & M. Maggi.** 2017. Assessing *in vitro* acaricidal effect and joint action of a binary mixture between essential oil compounds (thymol, phellandrene, eucalyptol, cinnamaldehyde, myrcene, carvacrol) over ectoparasitic mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J Apic Sci.* 61(2), 203-215
- **Cantwell G.** Standard methods for counting *Nosema* spores. *Am Bee J.* 1970; 110: 22–223.
- **Charbonneau, L.R., N.K. Hillier, R.E.L. Rogers, G.R. Williams y D. Shutler,** Effects of *Nosema apis*, *N. ceranae*, and co-infections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. *Scientific Reports*, 2016; 6:22626.
- **Chouhan, S., K. Sharma, S. Guleria.** 2017. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines.* 2017; 4(3): 58. doi:10.3390/medicines4030058.
- **Colin, M.E., J. Ducos de Lahitte, E. Larribau, T. Bou.** 1989. Activité des huiles essentielles de labiées sur *Ascosphaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie.* 1989; 20:221-28.
- **COLOSS Workshop Conclusions,** Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Coloss [Internet]. 2009 (publicado el 20 Nov 2009). Disponible en <https://coloss.org/core-projects/beebook/>
- **Costa, C., M. Lodesani, L. Maistrello.** 2010. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and



on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie*; 41: 141–150.

- **Cristina, R. T., Z. Kovačević, M. Cincović, E. Dumitrescu, F. Muselin, K. Imre, ... & N. Puvača.** 2020. Composition and efficacy of a natural phytotherapeutic blend against Nosemosis in honey bees. *Sustainability*, 12(14), 5868.
- **Damiani, N., N.J. Fernández, M.P. Porrini, L.B. Gende, E. Álvarez, F. C. Brasesco, M.D. Maggi, J.A. Marcangeli, M.J. Eguaras.** 2014. Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitol Res.* 2014; 113:701-9. doi:10.1007/s00436-013-3698-3.
- **Diáñez, F., M. Santos, C. Parra, M. J. Navarro, R. Blanco, & F. J. Gea.** 2018. Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Letters App Microbiol.* 67(4), 400-10.
- **Eiri, D. M., G. Suwannapong, M. Endler & J. C. Nieh.** 2015. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One*, 10(5), e0126330.
- **Emsen B., E. Guzman-Novoa, M. Md Hamiduzzaman, L. Eccles, B. Lacey, R. A. Ruiz-Pérez & M. Nasr.** 2016. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitology Research* volume 115, pages 175–181.
- **Evans, J.D. & R.S. Schwarz.** 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 2011; 19:1–7. doi:10.1016/j.tim.2011.09.003

- **Ezzat Abd El-Hack, M., M. Alagawany, M. Ragab Farag, R. Tiwari, K. Karthik, K. Dhama... & M. Adel.** 2016. Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *J Ess Oil Res.* 28(5), 365-82.
- **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT).** 2018. Production of Beeswax in World. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>.
- **Fries, I.** 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie*, 19(3), 319-328.
- **Fries, I., M.P. Chauzat, Y.P.Chen, V. Doublet, E. Genersch, S. Gisder... G.R. Williams.** 2013. Standard methods for *Nosema* research. In: Dietemann, V.; J.D. Ellis, P. Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research.* *J Apicul Res.* 2013;51(5): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- **Fries, W.K.I., F. Feng, A. Da Silva, S.B. Slemenda, N.J. Pieniazek.** 1996. *Nosema ceranae* (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European J Protistol* 1996; 32: 356–65.
- **Furgala, B. & M. J. Maunder.** 1961. A simple method of feeding *Nosema apis* inoculum to individual honey bees. *Bee World* 42(10): 249-252
- **Gabriel, K. T., L. Kartforosh, Crow, S. A., & Cornelison, C. T.** 2018. Antimicrobial activity of essential oils against the fungal pathogens *Ascosphaera apis* and *Pseudogymnoascus destructans*. *Mycopathologia*, 183(6), 921-934.

- **Giliam M. & H. Shimanuki.** 1967. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee Hemocytes. *J Invert Pathol.* 9 :387-389.
- **Giménez-Martínez, P., N. Cugnata, R. M. Alonso-Salces, D. Arredondo, K. Antúnez, K., R. De Castro & S. R. Fuselli.** 2019. Short communication: Natural molecules for the control of *Paenibacillus larvae*, causal agent of American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Span J Agric Res.* 17(3), e05SC01
- **Goblirsch, M., Z. Huang & M. Spivak.** 2013.. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *Plos One*, 8(3), e58165.
- **Gómez, A.** 1998. Nosemiasis y Varroasis, Situación actual. *Vida Apícola.* (España). 88:51-4.
- **Gómez-Moracho T., C. Bartolomé, X. Bello, R. Martín-Hernández, M. Higes, X. Maside.** 2015. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. *Infection Genetics Evol.* 2015; 31, 87–94.
- **Goulson, D., J. Thompson & A. Croombs.** 2018. Rapid rise in toxic load for bees revealed by analysis of pesticide use in Great Britain. *PeerJ*, 6, e5255.
- **Hedtke, K., P. M. Jensen, A. B. Jensen & E. Genersch.** 2011. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J Invert Pathol.* 108(3), 167-173.
- **Higes, M., M.J. Nozal, A. Alvaro, L. Barrios, A. Meana, R. Martín-Hernández R, et al.** 2011. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*; 42: 364–377.

- **Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, A.V. González-Porto, P. García-Palencia, A. Meana , ... & J.L.Bernal.** 2009. Honeybee colony collapse due in professional apiaries. *Environ Microbiol Reports*. 2009; 1(2): 110-3.
- **Huang, W.F., L.F. Solter, P.M. Yau, B.S. Imai.** 2013. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathogens*. 2013; 9: e1003185. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003185> PMID: 23505365
- **Jack, C. J., H. M. Lucas, T. C. Webster & R. R. Sagili.** 2016. Colony level prevalence and intensity of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS One*, 11(9), e0163522.
- **Klee, J., A. M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D. Q.Tam, ... & D. Message.** 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invert Pathol*. 96(1), 1-10. 64.65.
- **Kurze, C., J. Routtu & R. F. Moritz.** 2016. Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*. 119(4), 290-297.
- **Larsson J.I.R.** 1986. Ultrastructure, function and classification of Microsporidia, *Protistology* 1, 325– 90.
- **Lecocq, Antoine, et al.** 2016. Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific reports*. 6.1: 1-11.
- **Liu TP.** Ultrastructural changes in *Nosema apis* in the midgut of the honeybee treated with thimerosal *in vitro*. *Parasitol Res*. 1988; 74: 492-4
- **Lotmar, R.** 1939. Der Eiweiss-Stoffwechsel im Bienenvolk (*Apis mellifera*) während der Ueberwinterung. Verbandsdruckerei A.-G. Bern.

- **Maggi, M., K. Antúnez, C. Invernizzi, P. Aldea, M. Vargas, P. Negri, C. Brasesco, D. De Jong, D. Message, E. Weinstein Teixeira, J. Principal, C. Barrios , S. Ruffinengo, R. Rodríguez Da Silva, M. Eguaras.** 2016. Honeybee health in South America. *Apidologie*. 2016; 47:835-54. doi: 10.1007/s13592-016-0445-7.
- **Maistrello L, Lodesani M, Costa C, Leonardi F, Marani G, Caldon M, et al.** 2008. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*; 39: 436–45.
- **Martín-Hernández R., C. Botías, E. Garrido-Bailón, A. Martínez-Salvador, L. Prieto, A. Meana.** 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol.* 2012; 14 (8):2127–38.
- **Martín-Hernández R, A. Meana, P. García-Palencia, P. Marín, C. Botías, E. Garrido-Bailón, M. Higes.** 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(8):2554–7.
- **Martín-Hernández R, A. Meana, L. Prieto, A. Martínez-Salvador, E. Garrido-Bailón, M. Higes.** 2007. Outcome of colonization of *A. mellifera* by *N. ceranae*. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(20):6331–8.
- **Martín-Hernández, R., M. Higes, S. Sagastume, A. Juarranz, J. Dias-Almeida, G. E. Budge, & N. Boonham.** 2017. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *Plos one*, 12(2), e0170183.
- **Meana, A., R. Martín-Hernández, and M. Higes.** "2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees." *J Apicul Res*. 49.2 (2010): 212-214.

- **Ministerio de agroindustria. Presidencia de la nación.** 2017. Dirección nacional de alimentos y bebidas. Apicultura. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/homealimentos/apicultura/exportaciones.php>. Ultimo acceso: 6 de agosto de 2020.
- **Ministerio de agroindustria. Presidencia de la nación.** 2018. Dirección nacional de alimentos y bebidas. Apicultura. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/homealimentos/apicultura/documentos/mieln183anexo.pdf> ultimo acceso: 27 de agosto de 2020.
- **Moeller, F. E.** 1978. *Nosema* disease: Its control in honey bee colonies (no. 1569). Department of Agriculture, Science and Education Administration.
- **Nardoni, S., C. D'ascenzi, G. Rocchigiani, R.A. Papini, L. Pistelli, G. Formato, B. Najjar, F. Mancianti.** 2018. Stonebrood and chalkbrood in *apis mellifera* causing fungi: *in vitro* sensitivity to some essential oils. [Nat Prod Res.](#) 2018; 32:385-390. Doi: 10.1080/14786419.2017.1306703.
- **Naug, D.** 2014. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. *Biology Letters.* 10(11), 20140731.
- **Nelson, M., K.E. Ihle, M. K. Fondrk, R. Page, G. Amdam.** 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *Plos Biol.* 2007;5:673-677
- **Paxton, R., J. Klee, S. Korpela, I. Fries.** 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie.* 2007; 38-6:558.
- **Peng, Y., B. Baer-Imhoof, A. H. Millar & B. Baer.** 2015. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scient Reports.* 5(1), 1-11.

- **Porrini , M.P., P.M. Garrido, L.B. Gende, C. Rossini, L. Hermida, J.A. Marcángeli & M.J. Eguaras.** 2017. Oral administration of essential oils and main components: study on honey bee survival and *Nosema ceranae* development. J Apicul Res.. 2017; 56(5): 616-24.
- **Porrini, M.P., P.M. Garrido & M.J. Eguaras.** 2013. Individual feeding of honey bees: modification of the rinderer technique. J Apicul Res. 2013; 52: 194–195. Doi:10.3896/ibra.1.52.5.04
- **Potts, S.G., V. Imperatriz-Fonseca, H.T. Ngo, M.A. Aizen, J.C. Biesmeijer, T.D. Breeze, L.V. Dicks, L.A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele, A.J. Vanbergen.** 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. Nature. 2016; 540 (7632); 220-9. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature20588>.
- **Sanchez, C.; H. Castignani; M. Rabaglio.** 2018. El mercado apícola internacional. Pnapi 1112052- gestión de la innovación como aporte para el desarrollo territorial julio 2018. Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_cicpes\\_instdeconomia\\_sanchez\\_mercado\\_apicola\\_internacional.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_cicpes_instdeconomia_sanchez_mercado_apicola_internacional.pdf)
- **Schwarz, R.S., Q. Huang, J. D. Evans.** 2015. Hologenome theory and the honey bee pathosphere. Curr Opin Insect Sci. 2015; 10; 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.006>
- **Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).** 2014. Miel argentina de alta calidad endulza al mundo. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/infografias/miel-argentina-de-alta-calidad-endulza-al-mundo>
- **Smart, M. D., & W. S. Sheppard.** 2012. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). J Invert Pathol. 109(1), 148-151.

- **Traver BE y Fell RD.** Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) Colonies in Virginia. *J Invert Pathol.* 2011; 107(1): 43–49.
- **Tutum, H., N. Koç, A. Kart.** 2018. Plant essential oils used against some bee diseases. *Turkish J Agric-Food Sci Tech.* 2018; 6(1): 34-45.  
<https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i1.34-45.1502>
- **Van Den Heever, J.P., T.S.Thompson, S.J.G., Otto, J. M. Curtis, A. Ibrahim, S.F. Pernal.** 2016. Evaluation of fumagilin-b® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie*; 47: 617–30.
- **Williams, G.R., M.A. Sampson, D. Shutler, R.E.L. Rogers.** 2008. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *J Invert Pathol.* .2008; 99: 342–4.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.04.005> pmid: 18550078
- **Wolf, S., D. P. McMahon, K. S. Lim, C. D. Pull, S. J. Clark, R. J. Paxton & J. L. Osborne.** 2014. So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. *Plos one*, 9(8), e103989.
- **Zander, E.** 1909. Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene, *münchener bienenzeitung.* 1909; 31, 196–204.



## 9. INDICE DE TABLAS, FIGURAS E IMÁGENES

### 9.1. Tablas

Tabla 1.1. Principales destinos de exportación, producción Argentina. Fuente: MINAGRI, 2018.

Table 1.1. Main export destinations of Argentine production. Source: MINAGRI, 2018.

#### Exportaciones Argentina de miel (Enero-Octubre) según destino

DESTINO	VOLUMEN (ton)	VALOR FOB (US\$)	VALOR FOB US\$/ton
EEUU	31.270	67.428.509	2156,33
Francia	1.890	4.615.495	2442,06
Japón	4558	12.077.879	2649,82
Bélgica	2479	5.657.627	2282,22
Italia	1.598	3.726.983	2332,28
Alemania	8.614	20.413.749	2369,83
Suiza	544,099	1.199.344	2204,28
España	578,85	1.235.703	2134,76
Reino Unido	400,96	827.892	2064,77
Otros	4590	11.060.217	2409,63
TOTAL	56.523	128.243.398	2268,87

Fuente: Elaboración propia en base a datos de INDEC

Tabla 1.2. Análisis de componentes de los aceites esenciales en estudio. Identificación de los componentes de los aceites esenciales. Fuente: Cátedra de Química Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata; Recursos Biológicos, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar.

Table 1.2. Component analysis of the essential oils under study. Identification of the components of essential oils. Source: Agricultural Chemistry. Faculty of Agricultural and Forestry Sciences, National University of La Plata; Biological Resources, National Institute of Agricultural Technology (INTA) Castelar

Componentes principales	L. Junelliana	S. Hortensis
Limoneno	1,0-2,5	
Linalol		
Carvacrol		35.5
Mirceno	9,1-10,5	
Carvona	1,6-1,7	
cis-davanona	17,7-20.1	
Γ- terpineno		
p-cimeno		4.8
Mircenona	11,6-14,8	
Z-ocimenona	7,0-8,1	
E-ocimenonag	7,7-9,3	
β-carriofileno	4,4-6,0	1.9
Timol		0.3
Biciclo - germacreno	1.6-2.4	
β – pineno		2.2
α – pineno		1.1
Alcanfor	2,8-5,1	
Espatulenol	2,3-3,7	
Oxido cariofileno	2,0-3,7	
Camfeno	1,7-2,5	
α – terpineno		3.6
Trans-nerolidol	1,8-1,9	
Borneol		0.3
Gama-Terpineno		40.4
α –humulene	1,0-1,3	
α –terpineol	1,1-1,4	

Tabla 1.3. Test de Kruskal Walis supervivencia de abejas (%) en la interacción AE\*Dosis. Fuente: Original

Table 1.3. Kruskal Wallis test survival of bees (%) in the interaction AE \* Dose. Source: Original

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	AE	Dosis	N	D.E.	Medianas	H	p
%Supervivencia	LJ	500,00	60	25,17	91,67	46,18	<0,0001
%Supervivencia	LJ	1000,00	60	31,90	85,00		
%Supervivencia	LJ	2000,00	60	31,17	88,33		
%Supervivencia	LJ	4000,00	60	35,48	73,33		
%Supervivencia	SM	500,00	60	27,83	75,00		
%Supervivencia	SM	1000,00	60	29,37	90,00		
%Supervivencia	SM	2000,00	60	38,01	68,33		
%Supervivencia	SM	4000,00	60	40,50	30,00		
%Supervivencia	TESTIGO	500,00	60	20,64	83,33		
%Supervivencia	TESTIGO	1000,00	60	21,19	86,67		
%Supervivencia	TESTIGO	2000,00	60	20,64	83,33		
%Supervivencia	TESTIGO	4000,00	60	21,19	86,67		

Trat.	Ranks			
SM:4000,00	239,54	A		
SM:2000,00	306,96	A	B	
LJ:4000,00	308,74	A	B	
SM:500,00	326,86	B	C	
LJ:1000,00	375,93	B	C	D
TESTIGO:2000,00	378,25	B	C	D
TESTIGO:500,00	378,25	B	C	D
LJ:2000,00	385,05		C	D
TESTIGO:1000,00	389,17		C	D
TESTIGO:4000,00	389,17		C	D
SM:1000,00	404,05			D
LJ:500,00	444,04			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Tabla 1.4; Test de Kruskal Wallis de la Supervivencia de abejas (%). Interacción Aceites Esenciales\*Fecha. Fuente: Original.

Table 1.4; Kruskal Wallis Test of Survival of bees (%). Interaction Essential Oils \* Date. Source: Original

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	AE	Fecha	N	D.E.	Medianas	H	p
%Supervivencia	LJ	04/12/2019	16	0,00	100,00	593,69	<0,0001
Trat.	Ranks						
SM:18/12/2019	63,56	A					
SM:17/12/2019	68,59	A					
LJ:18/12/2019	79,72	A B					
SM:16/12/2019	82,94	A B					
LJ:17/12/2019	97,53	A B					
SM:15/12/2019	120,22	A B C					
LJ:16/12/2019	129,13	A B C D					
SM:14/12/2019	144,91	A B C D					
TESTIGO:18/12/2019	146,13	A B C D					
TESTIGO:17/12/2019	162,38	A B C D					
SM:13/12/2019	174,63	A B C D					
LJ:15/12/2019	182,41	A B C D E					
TESTIGO:16/12/2019	198,38	A B C D E F					
LJ:14/12/2019	221,66	B C D E F G					
SM:12/12/2019	243,00	C D E F G H					
TESTIGO:15/12/2019	252,88	C D E F G H I					
LJ:13/12/2019	261,47	C D E F G H I					
TESTIGO:14/12/2019	269,00	D E F G H I J					
SM:11/12/2019	269,13	D E F G H I J					
TESTIGO:13/12/2019	322,38	E F G H I J K					
SM:10/12/2019	336,88	F G H I J K					
LJ:12/12/2019	360,66	G H I J K L					
TESTIGO:12/12/2019	380,75	H I J K L					
TESTIGO:11/12/2019	393,88	I J K L M					
LJ:11/12/2019	407,09	J K L M					
TESTIGO:10/12/2019	408,63	J K L M					
SM:09/12/2019	430,28	K L M N					
TESTIGO:09/12/2019	441,00	K L M N O					
LJ:10/12/2019	455,09	K L M N O					
TESTIGO:08/12/2019	456,13	K L M N O					
SM:08/12/2019	464,91	K L M N O					
LJ:09/12/2019	487,59	L M N O					
P							
TESTIGO:07/12/2019	493,75	L M N O					
P							
LJ:08/12/2019	531,03	M N O					
P Q							
SM:07/12/2019	531,34	M N O					
P Q							
TESTIGO:06/12/2019	557,13	N O					
P Q							
LJ:07/12/2019	573,78	N O					
P Q							
SM:06/12/2019	584,00	O					
P Q							
LJ:06/12/2019	609,75						
P Q							
TESTIGO:05/12/2019	623,75						
P Q							
SM:05/12/2019	626,41						
P Q							
LJ:05/12/2019	630,19						
P Q							
LJ:04/12/2019	649,50						
Q							
SM:04/12/2019	649,50						
Q							
TESTIGO:04/12/2019	649,50						
Q							

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Tabla 1.5. Test de Kruskal Wallis de consumo de la solución de sacarosa + AE ( $\mu\text{L}$ ) de la interacción AE\*Dosis. Fuente: Original.

Table 1.5. Kruskal Wallis test for the consumption of the sucrose + EA solution ( $\mu\text{L}$ ) of the EA \* Dose interaction. Source: Original

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	AE	Dosis	N	Medias	D.E.	Medianas
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. LJ		500,00	60	0,05	0,01	0,05
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. LJ		1000,00	60	0,05	0,01	0,04
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. LJ		2000,00	60	0,04	0,01	0,04
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. LJ		4000,00	60	0,04	0,01	0,04
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. SM		500,00	60	0,05	0,01	0,05
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. SM		1000,00	60	0,04	0,01	0,05
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. SM		2000,00	60	0,04	0,02	0,04
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. SM		4000,00	60	0,03	0,02	0,03
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. TESTIGO		500,00	60	0,05	0,01	0,05
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. TESTIGO		1000,00	60	0,05	0,01	0,05
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. TESTIGO		2000,00	60	0,05	0,01	0,05
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. TESTIGO		4000,00	60	0,05	0,01	0,05

Trat.	Ranks
SM:4000,00	200,78 A
LJ:2000,00	300,31 B
LJ:4000,00	321,17 B
SM:2000,00	325,77 B C
SM:1000,00	351,39 B C D
LJ:1000,00	370,12 B C D
LJ:500,00	397,82 C D
TESTIGO:4000,00	404,25 D
TESTIGO:1000,00	404,25 D
TESTIGO:2000,00	415,87 D
TESTIGO:500,00	415,87 D
SM:500,00	418,42 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Tabla 1.6. Test de Kruskal Wallis de consumo de la solución de sacarosa + AE ( $\mu\text{L}$ ) de la interacción AE\*Fecha. Fuente: Original

Table 1.6. Kruskal Wallis test for the consumption of the sucrose + AE solution ( $\mu\text{L}$ ) of the AE \* Date interaction. Source: Origina

C:\Users\MaricelVega\Desktop\FACULTAD\TESINAS\Lagos Leandro\SM- LJ- Testigo. planilla 28-07.xls : 03/08/2020 - 15:48:58 - [Versión : 02/08/2016]

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	AE	Fecha	N	Medias	D.E.
Medianas	H	p			
cons. Ind. Sol. Sacarosa (.. LJ		04/12/2019	16	0,06	5,9E-04
				215,10	<0,0001

Prueba de Kruskal Wallis

Trat.	Ranks
TESTIGO:17/12/2019	171,63 A
SM:06/12/2019	182,38 A B
SM:13/12/2019	202,44 A B C
TESTIGO:08/12/2019	221,25 A B C D
LJ:06/12/2019	223,75 A B C D
SM:15/12/2019	225,72 A B C D
TESTIGO:07/12/2019	234,00 A B C D E
SM:12/12/2019	251,75 A B C D E F
LJ:16/12/2019	252,78 A B C D E F
TESTIGO:06/12/2019	260,00 A B C D E F
LJ:13/12/2019	267,28 A B C D E F G
LJ:12/12/2019	286,94 A B C D E F G H
SM:05/12/2019	288,22 A B C D E F G H
LJ:15/12/2019	289,59 A B C D E F G H
SM:11/12/2019	296,81 A B C D E F G H I
SM:16/12/2019	299,34 A B C D E F G H I
TESTIGO:09/12/2019	319,00 B C D E F G H I J
LJ:07/12/2019	328,63 C D E F G H I J
SM:08/12/2019	329,00 C D E F G H I J
LJ:09/12/2019	331,50 C D E F G H I J
LJ:18/12/2019	332,47 C D E F G H I J
LJ:08/12/2019	337,59 C D E F G H I J
LJ:10/12/2019	346,03 C D E F G H I J K
SM:14/12/2019	350,16 D E F G H I J K
SM:10/12/2019	356,00 D E F G H I J K
SM:09/12/2019	357,06 D E F G H I J K
SM:07/12/2019	362,78 D E F G H I J K
TESTIGO:10/12/2019	371,88 E F G H I J K
LJ:11/12/2019	375,28 E F G H I J K L
LJ:14/12/2019	381,25 F G H I J K L
SM:17/12/2019	382,06 F G H I J K L
TESTIGO:05/12/2019	408,00 G H I J K L M
SM:18/12/2019	412,06 H I J K L M
TESTIGO:12/12/2019	419,25 H I J K L M N
LJ:05/12/2019	420,03 H I J K L M N
TESTIGO:14/12/2019	440,25 I J K L M N O
LJ:17/12/2019	461,34 J K L M N O
P	
TESTIGO:11/12/2019	487,00 K L M N O
P	Q
TESTIGO:13/12/2019	519,38 L M N O
P	Q
TESTIGO:18/12/2019	549,25 M N O
P	Q
TESTIGO:15/12/2019	559,00 N O
P	Q
SM:04/12/2019	565,56 O
P	Q
LJ:04/12/2019	575,81 O
P	Q
TESTIGO:16/12/2019	585,50
P	Q
TESTIGO:04/12/2019	605,50

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 9.2.Figuras

### Proporción de producción de Miel natural por región

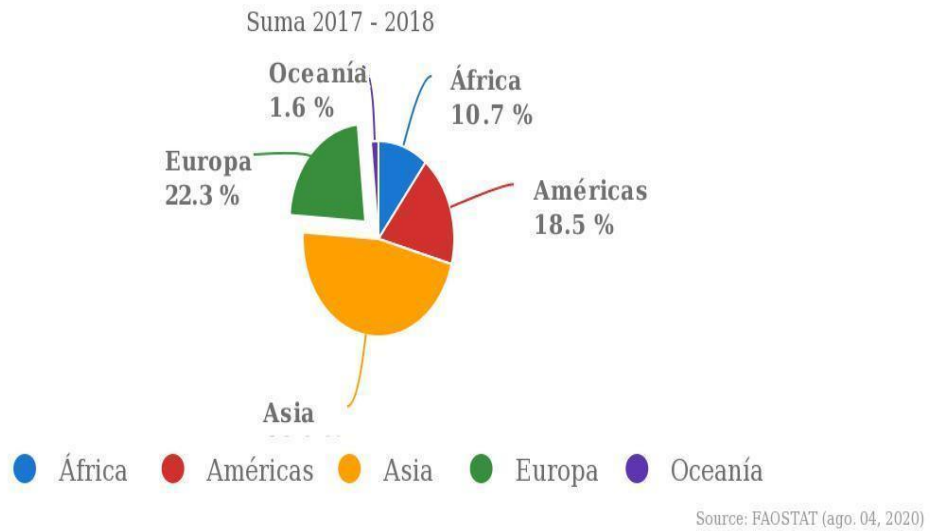
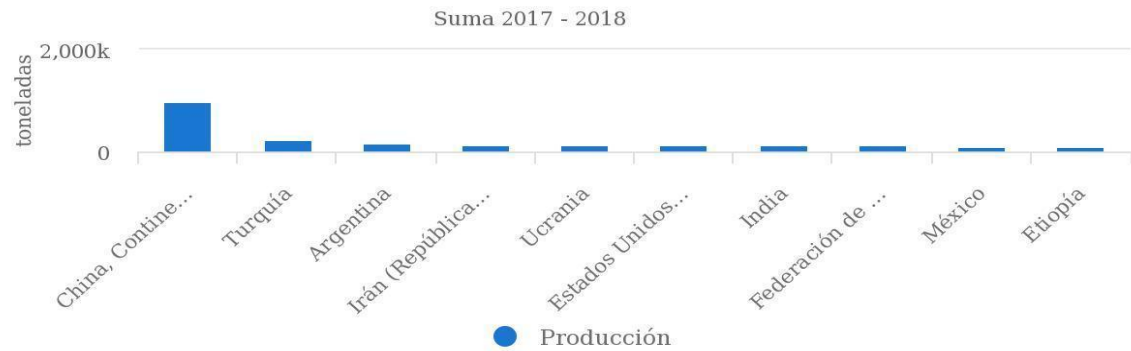


Figura 2.1. Porcentaje de producción mundial de miel por continente. Fuente: FAOSTAT

Figure 2.1. Percentage of world honey production by continent. Source: FAOSTAT

## Producción de Miel natural: los 10 productores principales



Source: FAOSTAT (ago. 04, 2020)

Figura 2.2. Principales países productores de miel a nivel mundial. Fuente: FAOSTAT.

Figure 2.2. Main honey producing countries worldwide. Source: FAOSTAT..

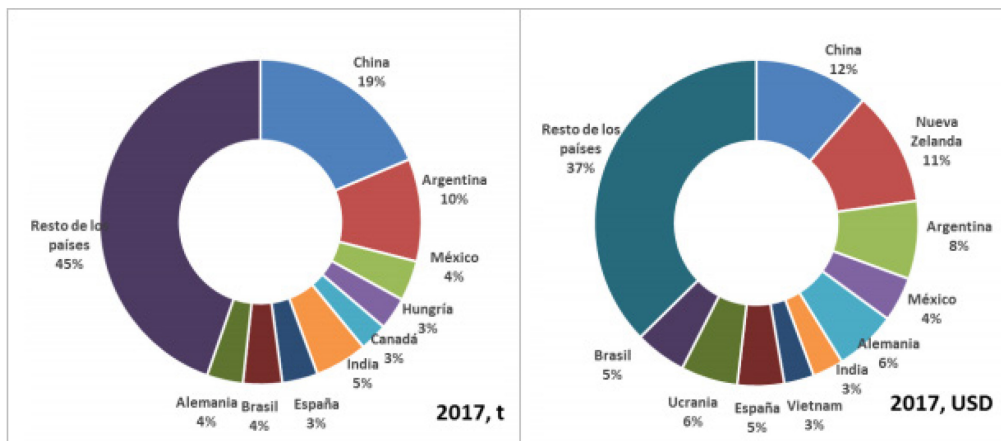


Figura 2.3. Principales exportadores mundiales de miel natural (Año 2017, en toneladas y USD). Fuente: MINAGRI.

Figure 2.3. Main world exporters of natural honey (Year 2017, in tons and USD). Source: MINAGRI



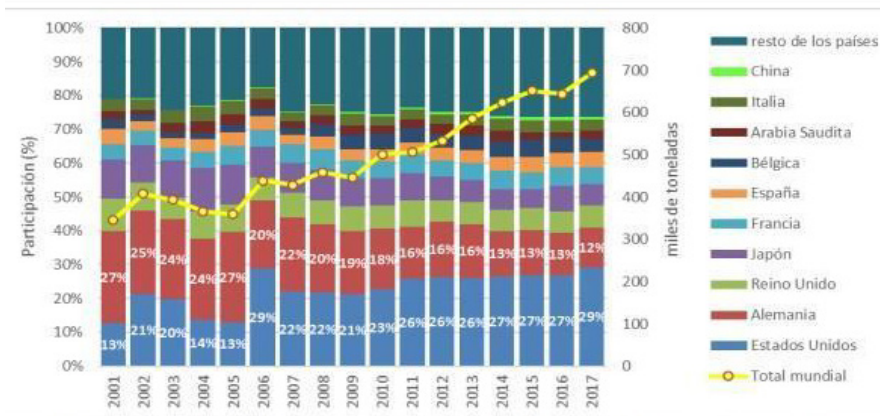


Figura 2.4. Evolución de la participación de los principales países en el volumen de las importaciones de miel (2001-2017; en % y miles de toneladas). Fuente: MINAGRI

Figure 2.4. Evolution of the participation of the main countries in the volume of honey imports (2001-2017; in % and thousands of tons). Source: MINAGRI

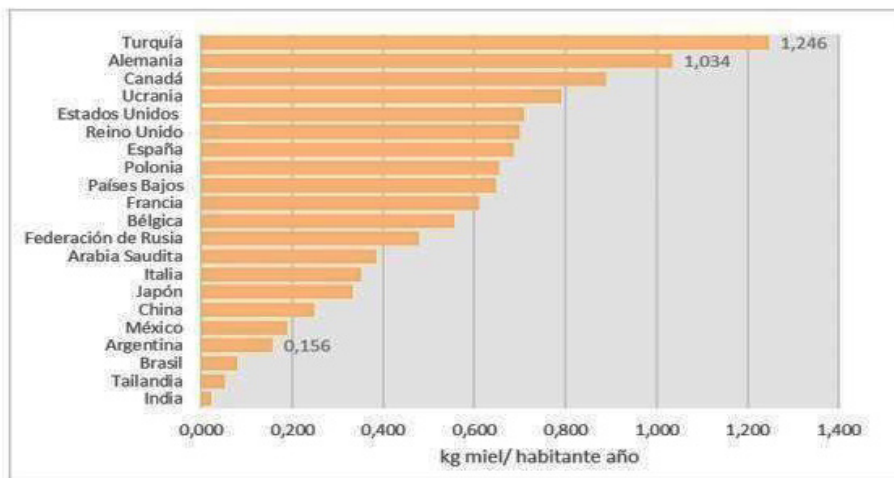
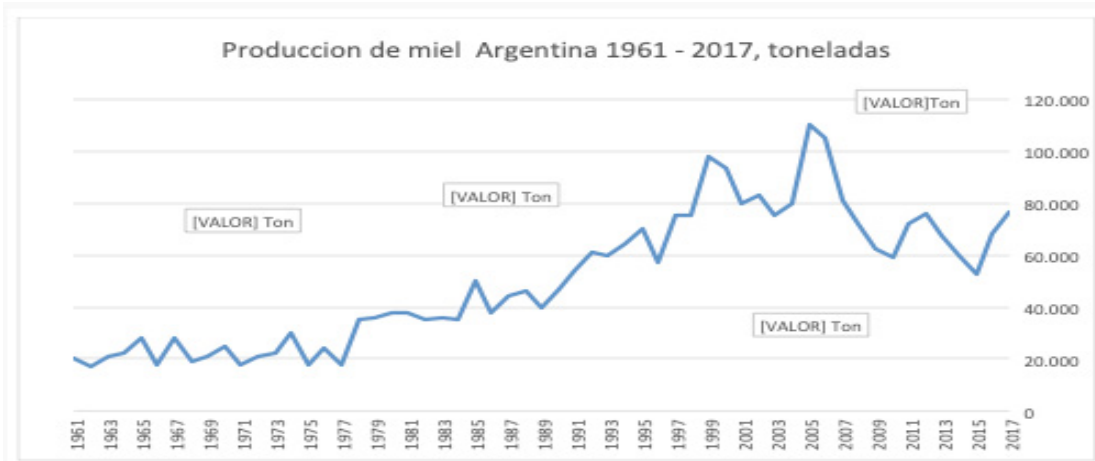


Figura 2.5; Consumo aparente per cápita de miel por principales países (en kg miel/ habitante año; promedio 2012/ 2016). Fuente: MINAGRI

Figure 2.5; Apparent per capita consumption of honey by main countries (in kg honey / inhabitant year; average 2012/2016). Source: MINAGRI



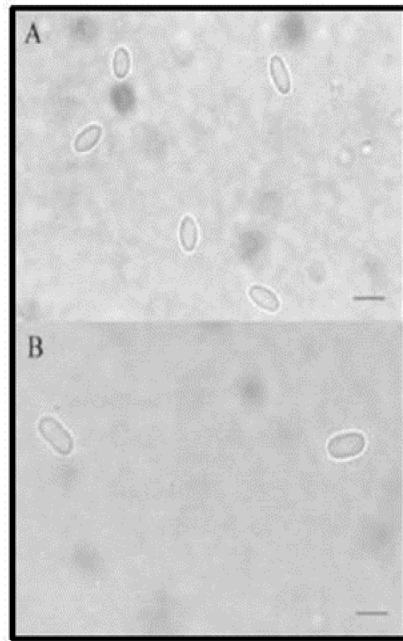
. Figura 2.6. Evolución de la producción nacional de miel en toneladas, de los últimos 50 años.

Fuente: MINAGRI

Figure 2.6; Evolution of the national production of honey in tons, of the last 50 years. Source:

MINAGRI

1

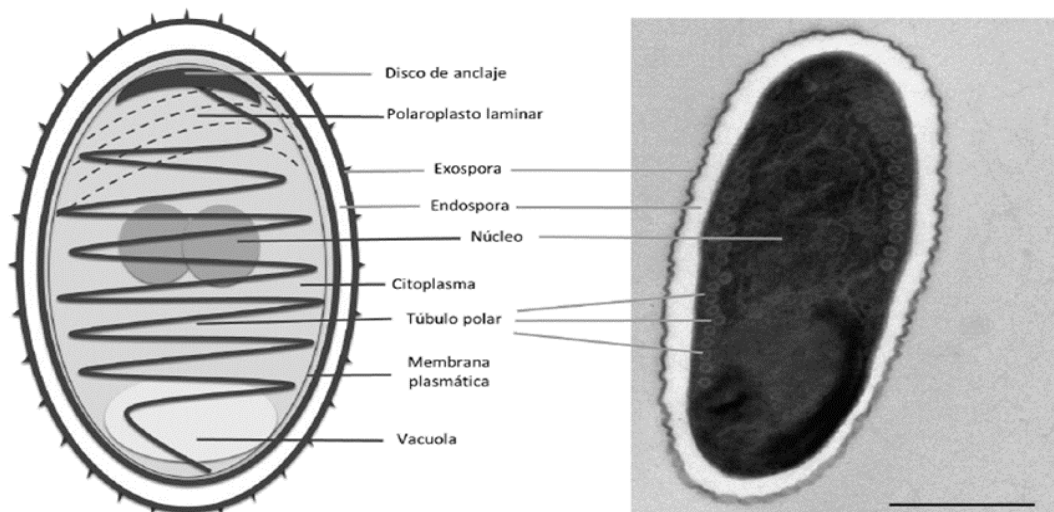


2 **Figura 2.7. Esporas de *N. ceranae* (A) y *N. apis* (B) mediante visualización en microscopía óptica**  
3 **400X. Fuente: Fries et al. 2010.**

4 **Figure 2.7. Spores of *N. ceranae* (A) and *N. apis* (B) by visualization in 400X optical microscopy.**  
5 **Source: Fries et al. 2010**

6

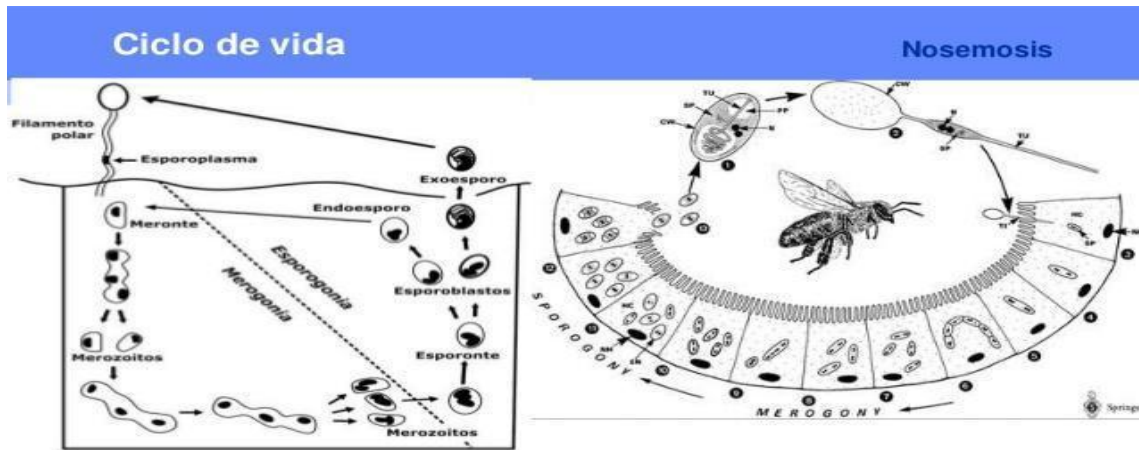
7



8 **Figura 2.8. Diagrama de la estructura interna de una espora de *Nosema* spp. madura bi-nucleada.**  
9 **Fuente: Higes y colaboradores, 2007.**

10 **Figure 2.8. Diagram of the internal structure of a spore of *Nosema* spp. mature bi-nucleate. Source:**  
11 **Higes and collaborators, 2007**

12



De Graaf et al. 1994  
Higes et al. 2007

13 **Figura 2.9. Ciclo de vida y reproducción del parásito Nosema spp. dentro del huésped. Fuente: De**  
14 **graaf et al. 1994 ; Higes et al. 2007.**

15 **Figure 2.9. Life cycle and reproduction of the parasite Nosema spp. inside the host. Source: De**  
16 **graaf et al. 1994; Higes et al. 2007.**

17

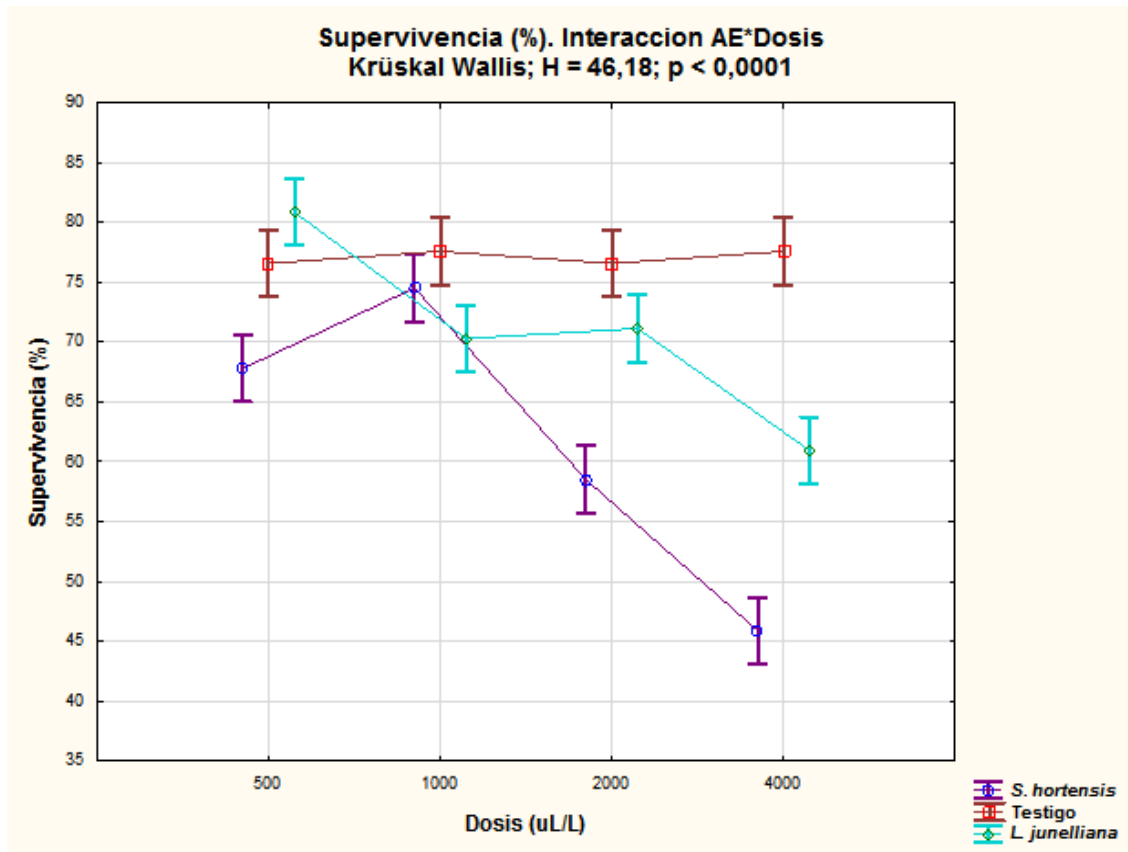
18

19

20

21

22

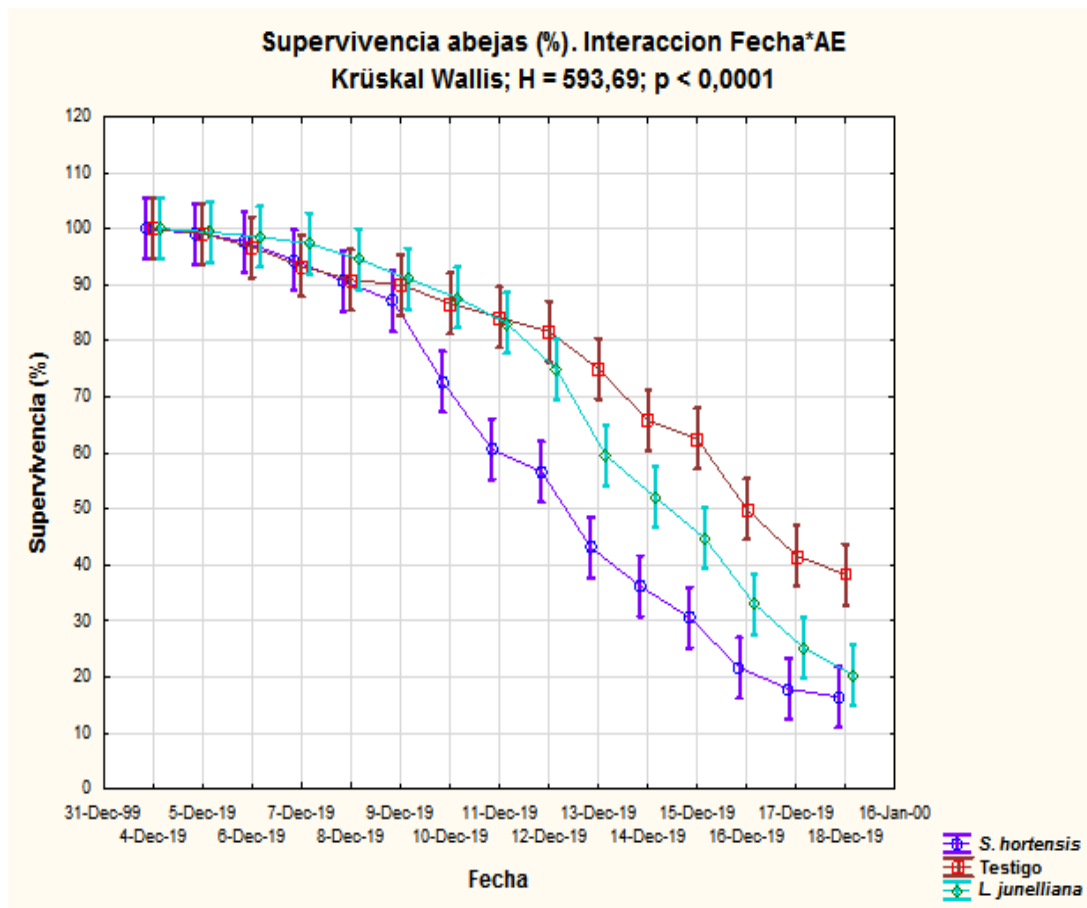


23 Figura 2.10. Supervivencia de la abeja (%) de la Interacción Aceite esencial\*Dosis. Fuente: Original.

24 Figure 2.10. Survival of the bee (%) of the Interaction Essential oil \* Dose. Source: Original

25

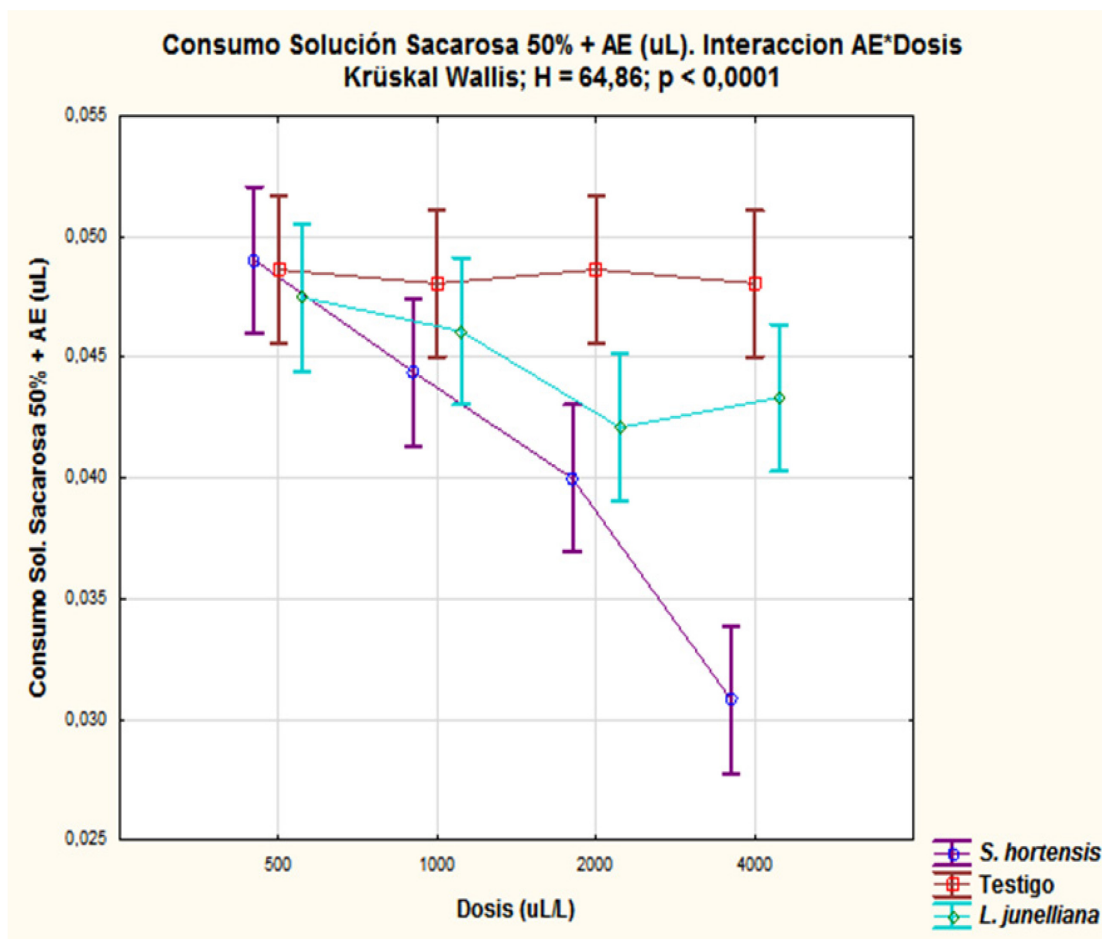
26



27 Figura 2.11. Supervivencia de la abeja. Interacción Fechas\*Aceite esencial. Kruskal Wallis; H =  
28 593,69; p < 0,0001.

29 Figure 2.11. Survival of the bee. Interaction Dates\*Essential oil. Kruskal Wallis; H = p  
30 <0.0001.

31



32 **Figura 2.12. Consumo de la Solución de sacarosa 50% + Aceites Esenciales (uL). Interacción**  
33 **AE\*Dosis. Krüskal Wallis; H = 64,86; p < 0,0001. Fuente: Original.**

34 **Figure 2.12. Consumption of the 50% sucrose solution + Essential Oils (uL). Interaction AE\*Dose.**  
35 **Krüskal Wallis; H = 64.86; p <0.0001. Source: Original.**

36

37

38

39

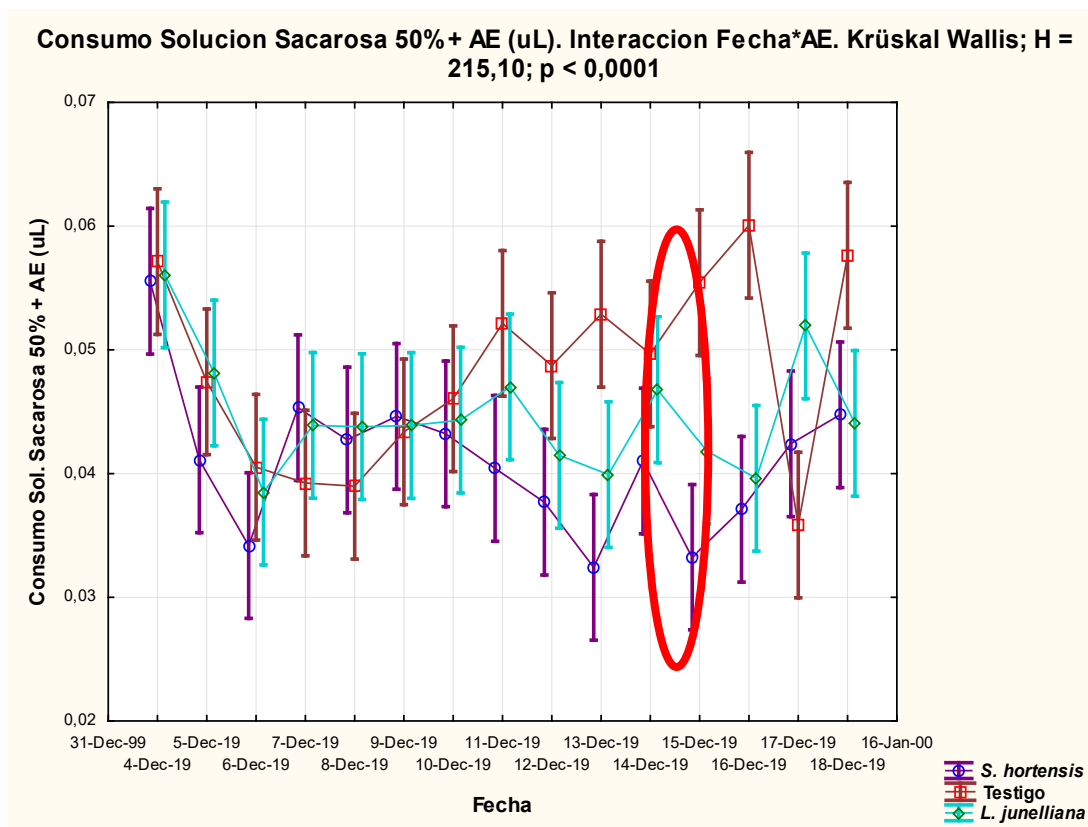
40

41

42

43

44



45 **Figura 2.13. Consumo de la Solución de sacarosa 50% + Aceites Esenciales ( $\mu$ L). Interacción**  
46 **AE\*Fecha. Kruskal Wallis; H =215,10; p < 0,0001. Fuente: Original.**

47 **Figure 2.13. Consumption of the 50% sucrose solution + Essential Oils ( $\mu$ L). Interaction AE\*Date.**  
48 **Kruskal Wallis; H = 215.10; p <0.0001. Source: Original.**

49

50

51

52

53

54

55

56



### 9.3. Fotografías

57

58



59 **Fotografía 3.1; Toma de muestras de abejas pecoreadoras en el apiario experimental de la FCAYF.**  
60 **UNLP.. Fuente: Original.**

61 **Photograph 3.1; Sampling of foraging bees in the experimental apiary of the FCAYF. UNLP. Source:**  
62 **Original.**

63



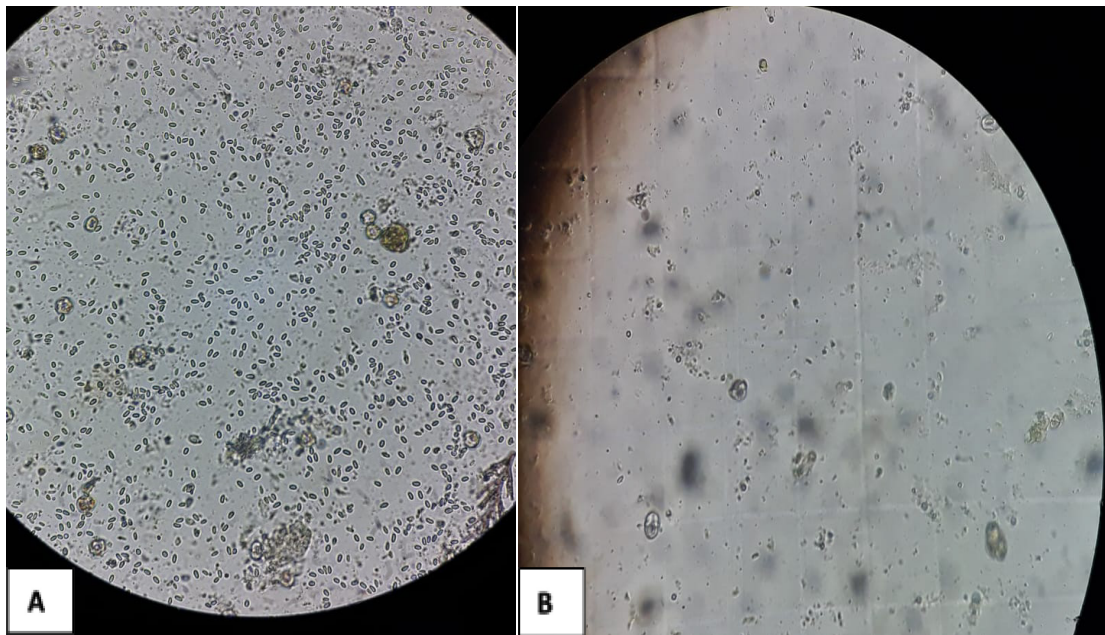
64

65 **Fotografía 3.2. Procesamiento de muestras para determinación de nivel de infección de**  
66 **Nosemosis. A: Materiales necesarios. B: Escisión del abdomen de abejas adultas. C: macerado**  
67 **dispuesto para el conteo de esporas . Fuente: Original.**

68 **Photograph 3.2. Processing of samples to determine the level of infection of Nosemosis. A:**  
69 **Laboratory materials used. B: Excision of the abdomen of adult bees. C: mash ready for spore**  
70 **count Source: Original.**

71

72



73

74 **Fotografía 3.3. Observación de esporas in cámara de Neubauer. A: Muestra con alta concentración**  
75 **de esporas. B: Muestra con bajo nivel de esporas. Fuente: Original.**

76 **Photograph 3.3. Observation of spores in the Chamber of Neubauer. A: Sample with high**  
77 **concentration of spores. B: Sample with low level of spores. Source: Original.**

78



79 **Fotografía 3.4. Contenedores plásticos de confinamiento y alimentación de abejas adultas.**  
80 **Fuente: Original.**

81 **Photograph 3.4. Plastic containers for confinement and feeding of adult bees. Source: Original.**

82

83



84

85 **Fotografía 3.5. Dispositivos de alimentación individual: Tubos plásticos con tip para inoculación.**  
86 **Fuente: Original.**

87 **Photograph 3.5; Individual feeding devices: Plastic tubes with tip for inoculation. Source: Original.**

88

89



90 **Fotografía 3.6. Proceso de Prueba del dispositivo de inoculación individual de abejas adultas.**  
91 **Fuente: Original.**

92 **Photograph 3.6 .Test Process of Adult Bee Single Inoculation Device . Source: Original.**

93

94

95

96

97

98

99 Las actividades que he desarrollado a lo largo de mi carrera estudiantil, que han  
100 aportado al desarrollo de mi trabajo Final de Carrera fueron:

101 • **Curso de Extensión en Apicultura. Edición 2019.**

102 Duración: Anual.

103 Estado: Cursado y Aprobado. Nota final:

104 Institución: FCAyF, UNLP.

105 Carga horaria: 150 hs.

106 • **Proyecto de Extensión “Producciones Familiares Periurbanas”. Ejecución  
107 2019.**

108 Carácter de participación: Participante.

109 Institución: FCAyF, UNLP.

110 Duración. Anual.

111

112 • **Curso de Extensión “Emprendimientos apícolas para la diversificación  
113 Productiva del Periurbano”. 2020.**

114 Carácter de Participación: Docente

115 Duración: bimestral.

116

117 • **Inglés 1.**

118 Carácter de participación: Estudiante

119 Duración: cuatrimestral

120 FCAyF, UNLP.

121 Aprobado.

122

123